



Régulations traductionnelles de l'embryon précoce d'oursin : recrutement des ARNm dans les polysomes à la fécondation

Héloïse Chasse

► To cite this version:

Héloïse Chasse. Régulations traductionnelles de l'embryon précoce d'oursin : recrutement des ARNm dans les polysomes à la fécondation. Biologie du développement. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066503 . tel-01330117

HAL Id: tel-01330117

<https://theses.hal.science/tel-01330117>

Submitted on 10 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole Doctorale 515 - Complexité du Vivant

Laboratoire de Biologie Intégrative des Modèles Marins UMR-CNRS 8227

Equipe Traduction, Cycle Cellulaire et Développement

Régulations traductionnelles de l'embryon précoce d'oursin

Recrutement des ARNm dans les polysomes à la fécondation

Par Héloïse Chassé

Thèse de doctorat de Biologie

Dirigée par Julia Morales

Présentée et soutenue publiquement le 8 décembre 2015

Devant un jury composé de :

Dr. Anne-Catherine Prats, DR INSERM, Toulouse

Rapporteur

Dr. Luc Paillard, Professeur Rennes I

Rapporteur

Dr. Dominique Weil, DR CNRS, Paris

Examineur

Dr. Alex McDougall, DR CNRS, Villefranche-sur-Mer

Examineur

Dr. Laurent Corcos, DR INSERM, Brest

Examineur

Dr. Julia Morales, CR CNRS, Roscoff

Directeur de thèse

À mon père

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Anne-Catherine Prats et Luc Paillard d'avoir accepté de juger ce travail, ainsi que Dominique Weil, Laurent Corcos et Alex McDougall d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je remercie également Muriel Umbhauer, Susana Coelho et Yann Audic, qui à travers mes comités de thèse, ont pu suivre les avancées de ce travail et ont su m'apporter soutien et conseils.

Merci à tous les membres de l'équipe de m'avoir accueillie pendant ces trois années. Je vous remercie vivement pour nos différents échanges. Vous avez su me donner l'occasion de m'affirmer, et d'apprendre à me faire confiance, et je vous en remercie sincèrement.

Julia, « Chef », j'ai énormément appris à tes côtés et ça a été un réel plaisir de former ce binôme avec toi. Tu m'as fait confiance en me permettant de mener à bien ce projet de thèse, et je t'en suis extrêmement reconnaissante. Je garderai un excellent souvenir de ce travail, et je te souhaite de le mener le plus loin possible. J'ai eu la chance que tu me considère toujours comme étant ton égale, et au fil du temps, tu es devenue à mes yeux bien plus qu'une chef. Merci pour tout.

Merci à Julie Aubert, Erwan Corre et Gildas Le Corguillé d'avoir participer à ce travail, sans qui on s'arracherait encore les cheveux. Merci à Lizenn, tu as été ma première étudiante, et j'en garde un excellent souvenir. Ton énergie à toute épreuve et ton franc-parler m'ont manqué au labo. Je te souhaite bon courage pour cette thèse qui commence, et je sais que tu vas t'en sortir comme une chef.

Mes remerciements se tournent à présent vers vous M. Mary. Vous êtes quelqu'un en qui j'ai très vite eu confiance. Je sais que ça vous est tombé dessus un peu comme ça, sans prévenir, peut-être de manière surprenante, mais je suis bretonne, entière, et ici, c'est comme ça. Merci du temps que vous m'avez accordé, vos conseils et nos discussions m'ont beaucoup apportés. C'était très important pour moi de te remercier Jean.

Céline, « Manche », merci à toi. C'est vrai qu'au début tu me faisais un peu peur. Il faut dire que tu râles beaucoup. Mais j'ai découvert quelqu'un d'extrêmement prévenant et de très investie (c'est tout de même grâce à toi qu'on est sorti de ce capharnaüm administratif), avec qui j'ai vraiment aimé passer du temps. Et ne t'inquiète pas, on reviendra.

Un très grand merci à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer à la Station. Merci pour nos échanges quotidiens et votre bonne humeur. Merci aussi au Gulf, à Barbara, Franck, Pascale, Isabelle et Maryline. Merci pour votre enthousiasme, vos encouragements, les papottes, et les yaourts. La Station a une chance incroyable de vous avoir. Merci aussi pour Noël dernier, vous vous êtes surpassés. Merci également à Alain, ta bonne humeur résonne dans tous les couloirs de la Station.

Je souhaite à présent remercier mes compagnons de galère, Emeline, Aga, Mati, Jean-Charles, Elodie, Javier, Pierre, Kevin, Rémy et Camille. Les copains, vous avez été extras. J'ai attrapé un coup de soleil qui risque de durer. Merci de m'avoir fait rentrer dans vos vies, merci de m'avoir fait relativiser, de m'avoir fait rire, merci pour tout ce temps qu'on a passé ensemble et qui restera le meilleur souvenir de ces trois ans passé à Roscoff. Merci à vous mes ti-chats.

L'Emeline, merci pour ces encouragements et cette bonne humeur systématique. Tes petites arrivées surprises des derniers mois dans le bureau m'ont fait beaucoup de bien. Gaga, thanks for everything. I'm really happy of having met you, and I promise you I'll come back soon (and often). Pierrot, si jamais tu lis ces lignes, on est peut-être des tocards, mais que tu le veuilles ou non, il va falloir te faire à l'idée qu'on est vraiment des amis. Keffin, merci beaucoup pour tes conseils, ta patience, et ta musique. Sache que si jamais je dois rechanter un jour, ce ne sera qu'en ta présence et celle de ton fameux « top » (éléments indispensables à l'épanouissement de ma voie de crécelle). Rrrrémy, venir dans ce bureau a été l'une de tes meilleures idées. Tu es quelqu'un qui compte énormément pour moi, et je pense que tu le sais. Il me tarde que l'on commence nos nouvelles aventures. Ma Pépette. C'est difficile ça. Un jour, j'ai eu une idée lumineuse qui a fait que pour beaucoup, on est les deux inséparables qui répondent à l'unisson. Moi, je dirai plutôt complémentaires. Comment te remercier suffisamment pour toutes les choses qu'on a partagées ? Tu as toujours été présente pour moi, tu as pris le temps de m'écouter, de me rassurer, mais surtout tu m'as appris à me faire confiance. De cette rencontre, j'en suis véritablement grandie.

Je voudrai remercier également les coupains de longue date, Agathe, Erwan, Camille, Chloé, Kevin, Syl, Ulric, Coulin et Lu. Merci à vous tous de toujours être présents. Ma Coulin, un très grand merci à toi. Que d'évènements depuis la B.U, mais on ne s'est jamais quittées, et ça ne risque pas d'arriver. Merci pour toutes ces discussions, moments de fous rire et moments improbables qui font le quotidien de cette belle amitié que je n'échangerai pour rien au monde. Ma Lu, jolie panthère, je te remercie énormément aussi. Tu fais partie des repères, qui quand je m'égare un peu, me ramènent toujours à terre. Merci pour ton soutien inconditionnel, depuis maintenant de nombreuses années.

Je tiens à présent à remercier ma famille. Merci à mon frère d'être là, et de savoir comment faire et quoi dire pour me rassurer. Tu ne t'en rends sûrement pas compte, mais tu es extrêmement important pour moi, et malgré la distance, elles sont rares les journées où je ne pense pas à toi. Merci à ma mère, mounette d'être elle. Tu m'accompagnes partout où je vais, et je suis fière d'être ta fille. Merci pour ton aide et tes encouragements, ils ont su m'apporter suffisamment de force pour que j'en arrive à écrire ces lignes aujourd'hui.

Enfin, merci à toi Clément. Ce travail ne serait pas ce qu'il est sans toi, et je ne serais pas qui je suis sans toi. Merci d'avoir participé à la construction de ce manuscrit, et d'avoir supporté mes sautes d'humeurs des derniers moments. Tu as ce don qui fait que tout paraît simple avec toi, quand dans ma tête à moi ça paraît insurmontable. Merci de toujours prendre le temps de m'écouter, même quand selon toi ça n'a pas de sens ; et de me comprendre, ce qui n'est pas toujours évident. Merci aussi de me faire rire et de refaire le monde avec moi chaque jour.

Merci de partager ma vie tout simplement. C'est toi.

Liste des abréviations

(u)ORF : (upstream) open reading frame

43S : complexe de pré-initiation

48S : complexe d'initiation de la traduction coiffe-dépendante

4E-BP : eIF4E binding protein

4E-IPs : eIF4E interacting proteins

4E-T : eIF4E transporter

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

ARNt : ARN de transfert

asTORi : active-site mTOR inhibitor

AUG : codon initiateur (méthionine)

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

c/n-Myc : cellular/nuclear-myelocytomatosis oncogene

CCR4-NOT : catabolite carbon repressor

4 : -negative regulator of transcription

CDK : cyclin dependant kinase

CITE : cap-independant translation enhancer

CPE : cytoplasmic polyadenylation element

CPEB : CPE-binding protein

CPSF : cleavage and polyadenylation specificity factor

DAP5 : death-associated protein 5

Dazl : deleted in azoospermia-like

DCP2 : decapping enzyme 2

DDX6 : DEAD box helicase 6

DLBCL : diffuse large B-cell lymphoma

DO : densité optique

eEFs : eukaryotic elongation factor

EGF : epidermal growth factor

eIF4F : complexe d'eIF4A-eIF4E-eIF4G

eIFs : eukaryotic initiation factors

Erk : extracellular signal-regulated kinase

FGF : fibroblast growth factor

FRAP/mTOR : FKBP12 rapamycin associated protein / [mammalian or mechanistic] target of rapamycin

GAP : GTPase activating protein

GCN2 : general control nonderepressible 2

GDI : GDP dissociation inhibitor

GDP : guanosine triphosphate

GEF : guanine nucleotide exchange factor

GLD-2 : germline development 2

GTP : guanosine triphosphate

HIF2 α : hypoxia inducible factor α

hnRNP-Q : heterogeneous ribonucleoprotein

h.p.f : hour post-fertilization

HRE : hypoxia response element

HRI : heme regulated inhibitor kinase

IGF : insulin growth factor

IMP : IGF2-mRNA binding protein

IRES : internal ribosome entry site

IRS1 : insulin receptor substrate 1

ITAF : IRES transacting factor

LARP-1 : La ribonucleoprotein 1

m⁷GTP : 7-Méthylguanosine 5'-triphosphate

MAPK : mitogen-activated protein kinase

Mcl-1 : myeloid cell leukemia 1
Mek : MAPK/Erk kinase
miR : micro ARN
miRNP : microRNA ribonucleoparticles
Mnk : MAPK interacting kinases
mRNP : mesenger ribonucleoparticles
mTOR : mammalian/mechanistic target of rapamycin
mTORC1/2 : mTOR complex 1/2
MZT : maternal-to-zygotic transition
NGDN : neuroguidin
nt : nucléotide
OET : oocyte-to-embryo transition
P-bodies : processing bodies
P13K : phosphoinositide 3-kinase
p53 : tumor protein 53
PABP : poly(A)-binding protein
PAIP : PABP interacting protein
PARN : poly(A) RNase
PDCD4 : programmed cell death protein 4
PDGF : platelet-derived growth factor
PDK1 : pyruvate dehydrogenase kinase 1
PERK : PKR-like endoplasmic reticulum kinase
PKC α : protéine kinase C α
PKR : protéine kinase R
PNG : kinase PAN GU
poly(A) : queue polyadénylée
R2 : petite sous-unité de RNR
Raf : Ras effector
Raptor : regulatory associated protein of mTOR
RBM4 : RNA-binding motif protein 4
RBP : RNA-binding protein
Rictor : rapamycin-insensitive companion of mTOR
RISC : RNA-induced silencing complex
Rluc/Fluc : renilla luciferase/firefly luciferase

RNR : ribonucleotide réductase
Rps6 : protéine ribosomale S6
RRM : RNA recognition motif
RTK : receptor tyrosine kinase
S6K : Rps6 kinase
TAE : translation activating element
TOP : terminal oligopyrimidine tract
TRAP : translating ribosome affinity purification
TRE : translation repressing element
TSC1/2 : tuberous sclerosis 1/2
UTR : untranslated region
V-ATPase : vacuolar- H^+ -ATPase
VEGF : vascular endothelial growth factor
XRN1 : 5'-3' exoribonuclease 1

Table des matières

INTRODUCTION.....	15
1. Régulation de l'expression des gènes	15
2. Régulation de la traduction à l'initiation	19
2.1. Initiation de la traduction	22
2.1.1. Formation du complexe de pré-initiation 43S.....	22
2.1.2. Formation du complexe eIF4F	22
2.1.3. Formation du complexe d'initiation 48S.....	23
2.2. Régulation de l'initiation.....	24
2.2.1. Régulation des facteurs d'initiation.....	24
2.2.1.1. Régulation d'eIF2.....	25
2.2.1.2. Régulation d'eIF4E	29
2.2.1.2.1. Intérêt de la régulation d'eIF4E	29
2.2.1.2.2. Régulation d'eIF4E par la protéine 4E-BP	30
2.2.1.2.3. Régulation d'eIF4E par phosphorylation.....	32
2.2.1.2.4. Familles d'eIF4E	33
2.2.1.2.4.1. eIF4E2	34
2.2.1.2.4.2. eIF4E3	35
2.2.1.3. Régulation d'eIF4G.....	38
2.2.1.4. Régulation de PABP.....	43
2.2.1.5. Régulation d'eIF4A.....	45
2.2.2. Voies de signalisation impliquées	47
2.2.2.1. Voie mTOR	47
2.2.2.1.1. mTORC1	48
2.2.2.1.2. mTORC2	50
2.2.2.2. Inhibition de la voie mTOR	50
2.2.2.3. Voie MAPK.....	52
2.2.2.4. Rétrocontrôles et liens mTOR / MAPK	53
2.2.3. Motifs régulateurs de l'ARNm.....	55
2.2.3.1. Queue poly(A).....	56

2.2.3.2.	micros ARN.....	60
2.2.3.3.	ARN messagers TOP	62
2.2.3.4.	IRES	62
2.3.	Étude du traductome cellulaire.....	66
3.	Importance des régulations traductionnelles pour le développement embryonnaire précoce.....	71
3.1.	Étude holistique de la transition ovocyte-embryon.....	73
3.1.1.	Chez la souris	73
3.1.2.	Chez la drosophile	75
3.2.	Développement précoce de l'embryon d'oursin et régulations traductionnelles	76
3.2.1.	Intérêt du modèle oursin.....	76
3.2.2.	Progression vers le premier cycle embryonnaire	77
3.2.3.	Régulations traductionnelles chez l'embryon d'oursin	80
3.2.3.1.	Facteurs d'initiation.....	80
3.2.3.2.	Utilisation des messagers maternels.....	82
4.	Objectifs de la thèse.....	86
	RESULTATS	89
1.	Article 1	89
2.	Article 2	119
3.	Article 3	151
4.	Article 4	201
	DISCUSSION	223
1.	Reprise de la traduction à la fécondation.....	223
1.1.	Démasquage des ARNm maternels.....	224
1.1.	Activation de la machinerie traductionnelle : 4E-BP : substrat de mTOR préférentiellement ciblé au cours du développement embryonnaire ?	225

2. Existence d'une voie alternative de traduction ?.....	227
2.1. La voie mTOR régule le recrutement des ARNm dans les polysomes de manière différentielle	227
2.2. Y aurait-il une prise de relai de la voie MAPK pour pallier l'inhibition de la voie mTOR ?	229
3. La traduction à la fécondation est sélective	231
3.1. La « signalisation » dans les starting-blocks ?	233
3.2. La traduction de certains transcrits pourrait-elle être préférentiellement localisée ?	233
3.3. La régulation du cycle est-elle plus complexe que prévu ?.....	234
3.4. La dégradation des ARNm maternels est-elle en préparation dès la fécondation ?	235
3.5. Et la machinerie traductionnelle dans tout ça ?	237
3.5.1. Préparer l'hypoxie à venir ?	238
3.5.2. Un complexe d'initiation spécifique du développement embryonnaire précoce ?	239
3.5.3. Pallier l'inhibition de la traduction en mitose ?	239
CONCLUSION.....	241
BIBLIOGRAPHIE	245
LISTE DES FIGURES.....	261
LISTE DES TABLEAUX	262

Introduction

1. Régulation de l'expression des gènes

L'ensemble des cellules d'un organisme pluricellulaire contient la même information génétique. Cependant, toutes les cellules ne sont pas dédiées à la même fonction dans l'organisme, par conséquent, les gènes qui s'expriment ne sont pas les mêmes. Pour ce faire, les cellules doivent disposer de mécanismes leur permettant une expression sélective des gènes opportuns. La sélectivité est associée à la notion de régulation, par la nécessité de contrôler l'expression des gènes nécessaires à un temps précis. Au-delà des spécificités de chaque type cellulaire impliquant une forte régulation d'expression, la régulation de l'expression des gènes est également essentielle à toute cellule pour répondre aux variations physiologiques et pathologiques. Ainsi, chaque niveau d'expression d'un gène est soumis à des régulations.

Au niveau de l'ADN, la régulation est tout d'abord une régulation épigénétique. Elle peut concerner l'ADN en lui-même (notamment par des méthylations), mais également la chromatine, association de protéines et d'ADN. Les histones associées à la double hélice formant les nucléosomes subissent diverses modifications post-traductionnelles (méthylations, acétylations, ubiquitinations, phosphorylations) dynamiques et transmissibles. L'ensemble de ces modifications est responsable de l'accessibilité de la double hélice pour la machinerie transcriptionnelle. De ce fait, en interphase la chromatine peut être sous les deux formes opposées que sont l'hétéro- ou l'euchromatine. Dans le premier cas, la chromatine est condensée et l'ADN ne peut être transcrit. Dans le cas inverse, elle est relâchée, ce qui rend l'ADN accessible à la machinerie transcriptionnelle. Dans ce contexte, la transcription peut avoir lieu, ce qui détermine la quantité d'ARN produite.

Le contrôle de la transcription est sous la responsabilité de protéines spécifiques appelées facteurs de transcription, qui sont activés par réception d'un signal extra- ou intracellulaire. Ils sont généralement classés en deux groupes distincts, en fonction de leur activité globale ou ciblée. Les facteurs de transcription sont dits généraux s'ils se fixent sur un promoteur central en amont du site d'initiation de la transcription, et s'associent à l'ARN

polymérase. En revanche, les facteurs de transcription sont dits spécifiques s'ils se fixent sur des séquences particulières de l'ADN, activatrices, amplificatrices ou répressives de la transcription.

Après sa synthèse, l'ARN subit de nombreuses modifications post-transcriptionnelles au cours des étapes successives de la maturation de l'ARN pré-messager (stabilité, épissage alternatif, l'export) (**Figure. 1**).

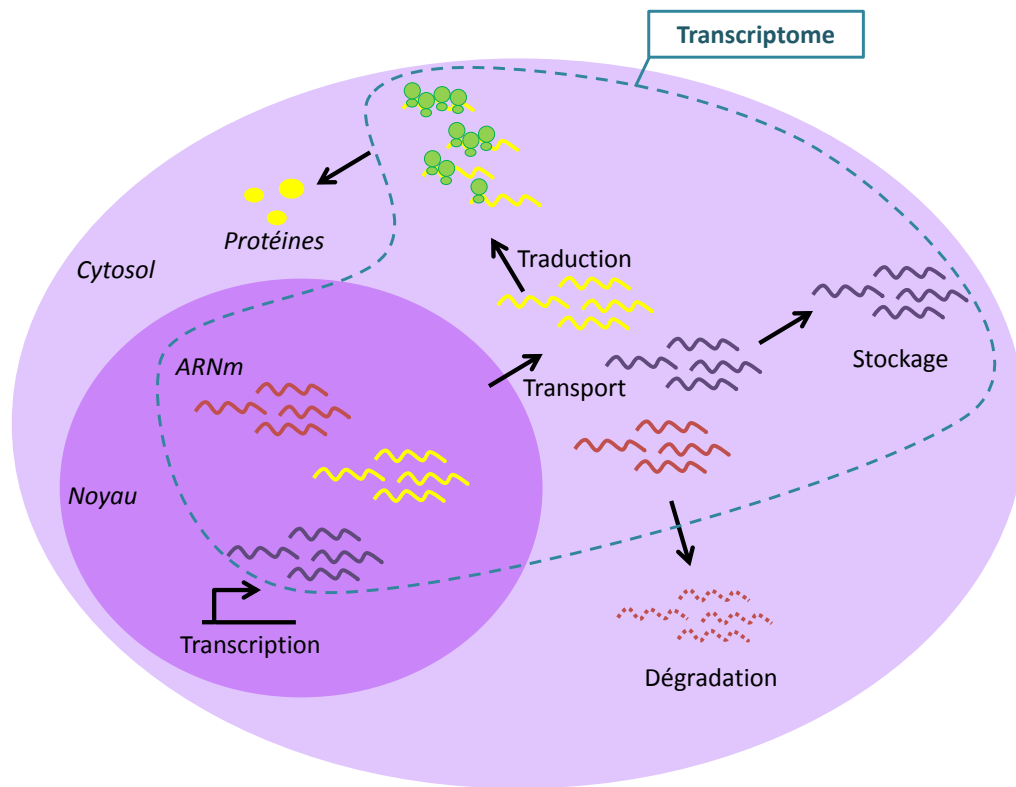


Figure 1 : Régulation de l'ARN. Lorsque l'ARN est transcrit, il mature dans le noyau (ajout de la coiffe et de la queue poly(A)), et est exporté vers le cytoplasme. Il est ensuite stocké, traduit ou dégradé. L'ensemble des messagers de la cellule appartient au transcriptome cellulaire. Modifié d'après Piccirillo, C. et al., (2014).

Au cours de la maturation du pré-messager chez les eucaryotes, une coiffe 5' m⁷-GTP et une queue 3' poly(A) sont ajoutées à l'ARNm. Ces deux structures spécifiques des eucaryotes empêchent la dégradation du messager par les exonucléases, facilitent son export et jouent un rôle crucial dans l'initiation de la traduction chez les eucaryotes. Le messager subit ensuite une étape d'épissage. L'épissage est l'élimination des introns de l'ARN, pour ne conserver que les exons. L'épissage peut également être alternatif, dans ce cas, certains exons sont inclus ou exclus du pré-messager. Le transcrit d'un même gène donne ainsi plusieurs ARNm matures, qui codent pour différents variants protéiques. La traduction des ARNm peut

être régulée à travers les régulations de la machinerie traductionnelle, et par la présence de motifs ou structures au sein même du transcrit (**Figure. 2**).

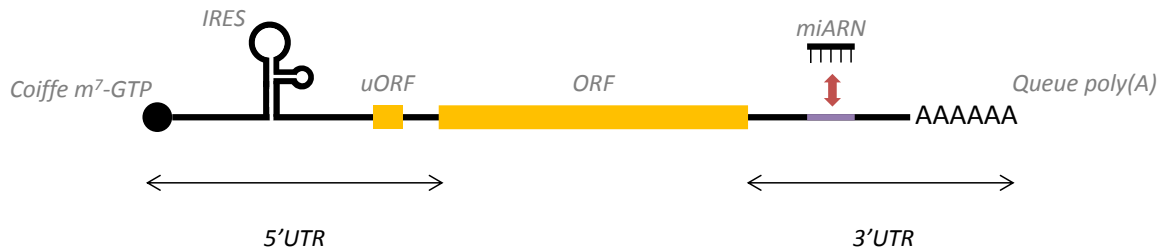


Figure 2 : Structure de l'ARNm mature. L'ARNm eucaryote porte toujours une coiffe en 5'UTR, le cadre ouvert de lecture ORF, et souvent une queue poly(A) en 3'UTR. De plus, l'ARNm peut éventuellement contenir un IRES et des uORF en 5'UTR, et une séquence d'ancrage de miR en 3'UTR. Les motifs cis-régulateurs de liaison aux protéines de liaison à l'ARN peuvent se trouver en 5' comme en 3'UTR.

Après la traduction, la protéine subit différentes modifications post-traductionnelles. Elles régulent sa fonction, sa localisation, sa conformation ou encore sa demi-vie. Il existe un très grand nombre de modifications post-traductionnelles. La protéine néosynthétisée peut subir l'addition d'un groupement fonctionnel (acétylation, méthylation, phosphorylation, *etc.*), d'un groupement peptidique (par exemple une ubiquitination), mais elle peut également subir des changements structuraux, tels que la formation de ponts disulfures.

La régulation de l'expression génique est un processus complexe, faisant intervenir tout un réseau de régulations consécutives, débutant à l'origine de l'information génétique, l'ADN, jusqu'à l'acteur physique de cette information, la protéine. Il a longtemps été considéré que les régulations transcriptionnelles étaient seules responsables de la régulation génique. A présent, il est admis que les régulations traductionnelles sont cruciales pour une régulation fine de l'expression des protéines, en particulier lorsque les protéines ont une courte demi-vie.

La traduction consomme 90% de l'énergie cellulaire, tandis que la consommation énergétique de la transcription est inférieure à 10%. De plus, 80% de l'énergie dédiée à la traduction sont utilisés pour seulement 20% des protéines (Buttgereit and Brand, 1995; Schwanhäusser et al., 2011). Dans le but de minimiser les pertes énergétiques, et d'obtenir une réponse cellulaire rapide à un stimulus, ce sont les régulations traductionnelles qui sont

responsables de plus de la moitié des variations de concentrations protéiques intracellulaires (Schwanhäusser et al., 2011; Schwanhäusser et al., 2013).

Les régulations traductionnelles ont lieu au cours des trois phases successives de la traduction (initiation, élongation et terminaison), et touchent à l'efficacité de la machinerie traductionnelle.

La phase d'initiation consiste au recrutement de la machinerie traductionnelle sur l'ARN messager, et au démarrage de la traduction. Lorsque la traduction est initiée, l'ARNm entre dans la phase d'élongation. Lors de cette étape, les acides aminés codés par l'ARNm sont ajoutés successivement au peptide en cours de synthèse. L'élongation se termine à la reconnaissance du codon stop, l'ARNm entre alors dans la phase de terminaison de la traduction. Elle est responsable de la dissociation des deux sous-unités ribosomales fixées au messager depuis l'initiation, et de la libération de la protéine néosynthétisée.

La régulation traductionnelle d'un ARNm particulier est possible grâce à l'action orchestrée de facteurs agissant en *trans* et d'éléments présents en *cis*, et a essentiellement lieu au cours de l'étape d'initiation. Ces différentes régulations sont détaillées dans la partie suivante.

2. Régulation de la traduction à l'initiation

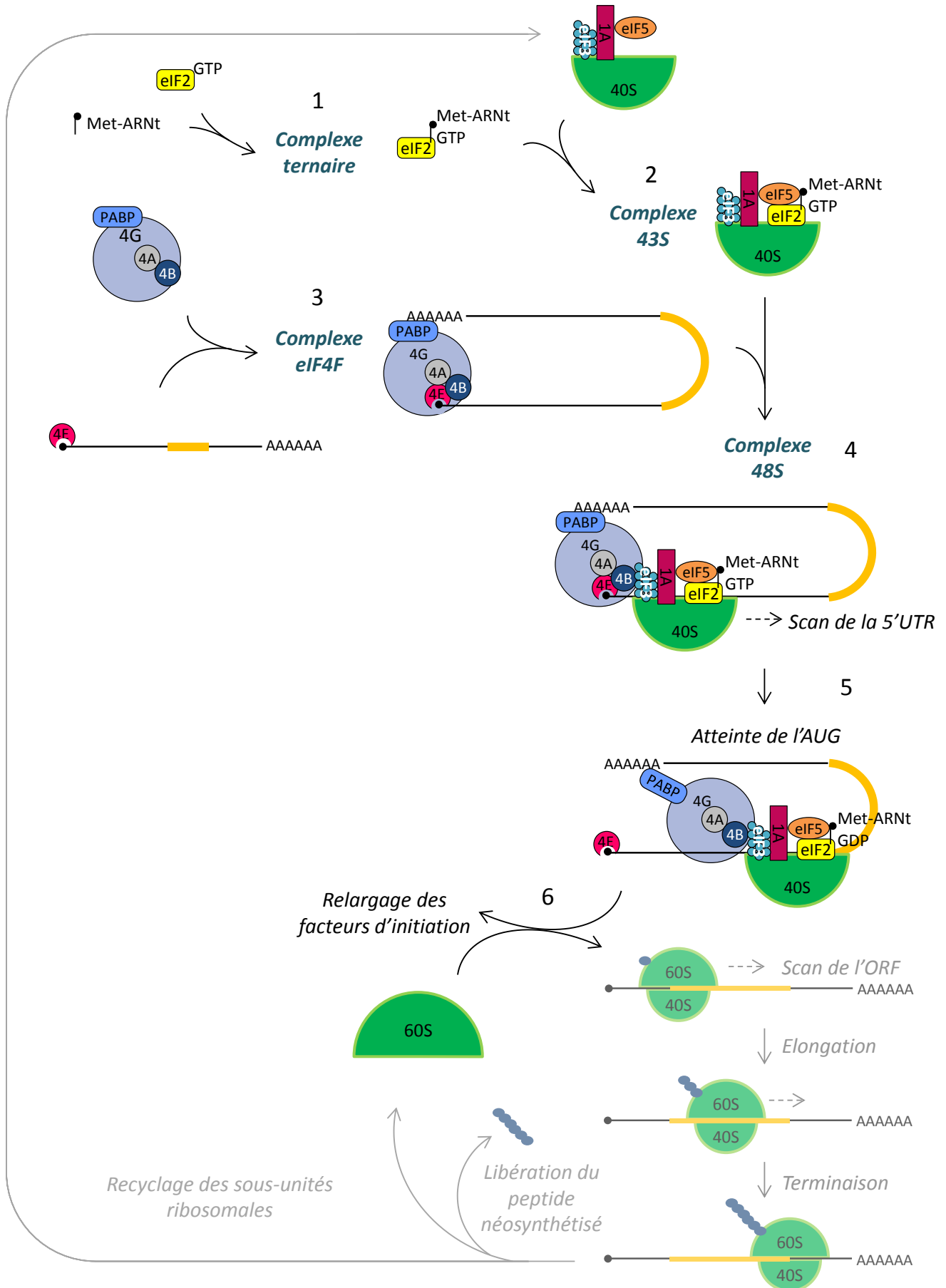
Bien que les trois phases de la traduction soient régulées, les régulations touchent majoritairement l'étape d'initiation. L'initiation permet à la machinerie traductionnelle de se mettre en place sur l'ARNm. Elle fait intervenir au moins treize facteurs d'initiation de la traduction (ou eIFs pour *eukaryotic Initiation Factors*) et le facteur auxiliaire PABP (Tableau. I).

Tableau I : Facteurs d'initiation de la traduction eucaryotes

Nom	Sous-unités	Masse moléculaire (kDa)	Fonction
eIF1	1	12.7	S'assure de la fidélité de sélection du codon initiateur, favorise le balayage du ribosome sur l'ARNm et stimule la liaison du complexe ternaire à la petite sous-unité ribosomales pour former le complexe 43S
eIF1A	1	16.5	Stimule la liaison du complexe ternaire à la petite sous-unité ribosomale pour former le complexe 43S, et coopère avec eIF1
eIF2	3	36.1/38.4/51.1	Forme le complexe ternaire (eIF2-GTP-Met-ARNt ^{Met}) se liant à la sous-unité 40S du ribosome
eIF2B	5	33.7/39/50.2/59.7/80.3	GEF (<i>Guanosine nucleotide Exchange Factor</i>) favorisant l'échange GDP-GTP pour eIF2
eIF3	13	800 au total	Stimule la liaison du complexe ternaire à la petite sous-unité ribosomale pour former le complexe 43S, lie le complexe 43S au complexe eIF4F (via la petite sous-unité 40S du ribosome et eIF4G), empêche la liaison des sous-unités ribosomales 40S et 60S avant l'atteinte de l'AUG initiateur
eIF4A	1	16.5	ARN-hélicase qui déroule les structures secondaires de l'ARNm pour favoriser le balayage
eIF4B	1	69.3	Protéine se liant à l'ARN (RBP) améliorant l'activité hélicase d'eIF4A
eIF4E	1	24.5	Protéine de liaison à la coiffe m ⁷ -GTP de l'ARNm
eIF4G	1	175.5	Protéine plateforme liant eIF4E, eIF4A, eIF4B pour former le complexe eIF4F, liant PABP pour une meilleure efficacité de traduction, et liant eIF3 pour former le complexe 48S
eIF4H	1	27.4	Homologue d'eIF4B favorisant également l'activité hélicase d'eIF4A
eIF5	1	49.2	GAP (<i>GTPase-Activating Protein</i>) spécifique d'eIF2-GTP provoquant l'hydrolyse du GTP en GDP à la reconnaissance de l'AUG initiateur
eIF5B	1	138.9	GTPase responsable de l'association des deux sous-unités ribosomales
eIF6	1	26.6	Se lie à la sous-unité 60S du ribosome et empêche l'association des deux sous-unités ribosomales 40S et 60S au début de l'initiation
PABP	1	70.7	Protéine liant eIF4G et la queue poly(A) de l'ARNm, favorisant l'efficacité de traduction

Ils permettent le recrutement des deux sous-unités ribosomales, la lecture du message, et l'association du codon initiateur AUG avec l'anticodon porté par l'ARN de transfert (ARNt) initiateur. Chez les eucaryotes, l'essentiel de la traduction se fait de manière dépendante de la coiffe (von der Haar et al., 2004). Un schéma général de l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe chez les eucaryotes est présenté en **Figure. 3**.

Figure 3: Initiation de la traduction chez les eucaryotes. L'initiation de la traduction se décompose en six étapes essentielles. (1) La première étape est l'association de l'ARNt initiateur, chargé en méthionine et d'eIF2, chargé en GTP, pour former le complexe ternaire. (2) Par la suite, l'association du complexe ternaire et de la petite sous-unité ribosomale (40S), portant déjà eIF1A, eIF3 et eIF5 induit la formation du complexe 43S. (3) En parallèle de (1) et (2), le complexe eIF4F avec ses modulateurs (eIF4A/eIF4E/eIF4G + eIF4B/PABP) se forme, par interaction de la protéine de liaison à la coiffe eIF4E et de la protéine plateforme eIF4G. PABP permet la circularisation de l'ARNm lié à eIF4E pour faciliter la traduction. (4) L'association des complexes 43S et eIF4F forme le complexe 48S, complexe actif de l'initiation de la traduction. (5) Celui-ci scanne la région 5'UTR de l'ARNm jusqu'à atteindre le codon start (AUG) du cadre ouvert de lecture. (6) A l'atteinte de l'AUG, les facteurs d'initiation de la traduction sont relargués, et la grande sous-unité ribosomale (60S) s'associe à la petite pour former le ribosome. Cette étape signe la fin de l'initiation et le début de l'élongation de la traduction. Lorsque le ribosome atteint le codon stop du cadre ouvert de lecture, il s'agit de la phase de terminaison, le peptide néosynthétisé ainsi que les deux sous-unités ribosomales sont relargués. Les sous-unités ribosomales sont ensuite recyclées pour qu'elles puissent intervenir une nouvelle fois dans la traduction d'un message. Modifié d'après Jackson et al., (2010).



2.1. Initiation de la traduction

Le complexe d'initiation de la traduction est l'association de deux complexes qui se forment en parallèle : le complexe de pré-initiation 43S et le complexe eIF4F.

2.1.1. Formation du complexe de pré-initiation 43S

La formation du complexe de pré-initiation 43S nécessite au préalable la formation du complexe ternaire eIF2-GTP-Met-ARNt_i^{Met}. La méthionine initiatrice qui formera l'extrémité *N*-terminale de la protéine s'associe au facteur d'initiation eIF2 et au GTP pour former le complexe ternaire eIF2-GTP-Met-ARNt_i^{Met}. Celui-ci s'associe à la petite sous-unité ribosomale 40S et aux facteurs eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5 pour former le complexe de pré-initiation 43S. Les deux sous-unités ribosomales sont maintenues dissociées par différents facteurs d'initiation : eIF1A se lie à la sous-unité 40S et empêche son association avec la sous-unité 60S ; tandis qu'eIF6 se lie à la sous-unité 60S et empêche son association avec la sous-unité 40S. Les facteurs eIF1 et eIF1A permettent un changement de conformation de la sous-unité 40S du ribosome, ce qui ouvre le site de liaison à l'ARN (Passmore et al., 2007). Ce mécanisme faciliterait le balayage de l'ARNm par le complexe d'initiation.

2.1.2. Formation du complexe eIF4F

Le complexe eIF4F est composé de trois facteurs d'initiation de la traduction (eIF4A, eIF4E et eIF4G) et de modulateurs (eIF4B et/ou eIF4H et PABP).

Le facteur eIF4E se lie à la coiffe m⁷-GTP de l'ARNm (Sonenberg et al., 1978; Sonenberg et al., 1979). Il recrute la protéine plateforme eIF4G, sur laquelle se fixent plusieurs facteurs d'initiation. eIF4A, qui fait partie des facteurs recrutés par eIF4G, est une hélicase de l'ARN permettant de dérouler les structures secondaires en 5'UTR (*UnTranslated Region*) de l'ARNm, et de faciliter le déplacement du complexe d'initiation. L'efficacité de cette hélicase est potentialisée par eIF4B, un autre facteur d'initiation se liant à l'ARN. Cette efficacité peut également être stimulée par la protéine eIF4H (Rogers et al., 2001). La protéine PABP (*Poly(A) Binding Protein*), qui fixe la queue poly(A) du messenger est également recrutée par la protéine plateforme eIF4G. Elle augmente la stabilité du messenger en assurant la protection de la chaîne d'adénosine contre une dégradation par des exonucléases. Les liaisons de PABP à eIF4G et à la poly(A) rapprochent les régions 5' et

3'UTR du messenger et provoquent une circularisation de l'ARNm. PABP permet une synergie entre la coiffe et la poly(A) de l'ARN, ce qui augmente les efficacités de traduction et de recyclage des composantes du complexe d'initiation. Cet état de l'ARNm et du complexe d'initiation de la traduction est appelé « modèle en boucle » (Kahvejian et al., 2001).

2.1.3. Formation du complexe d'initiation 48S

L'association des deux complexes multiprotéiques 43S et eIF4F se fait par l'intermédiaire de l'association d'eIF4G (eIF4F) et d'eIF3 (43S) pour former le complexe d'initiation 48S (**Figure. 4**).

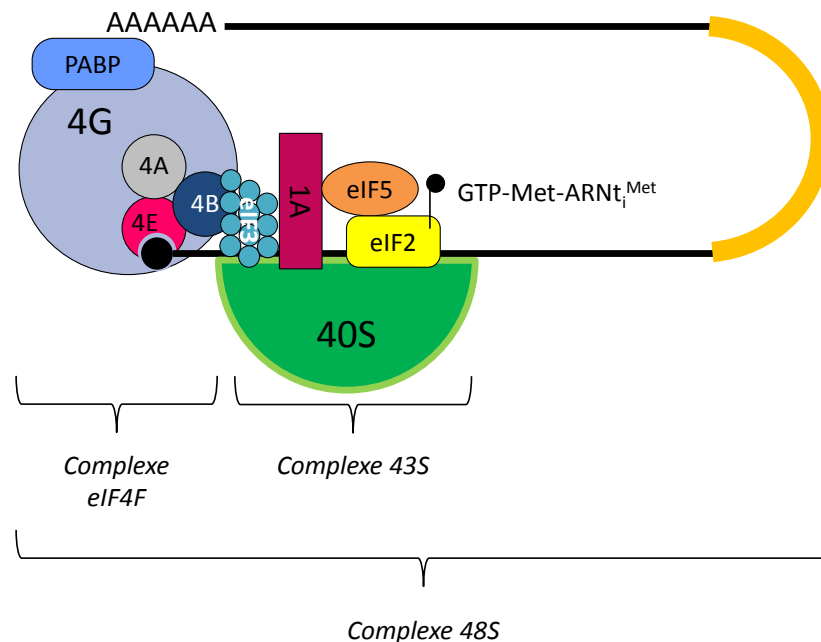


Figure 4 : Modèle en boucle du complexe d'initiation de la traduction dépendant de la coiffe. Le complexe d'initiation de la traduction se décompose en deux complexes multiprotéiques, le complexe eIF4F et le complexe 43S qui s'associent pour former le complexe 48S. Le complexe eIF4F est composé de la protéine de liaison à la coiffe eIF4E, de la protéine plateforme eIF4G, et de l'hélicase eIF4A aidée par eIF4B (et/ou eIF4H). Le complexe 43S est composé du complexe ternaire : eIF2-GTP-Met-ARNt^{Met}, d'eIF5, d'eIF1A, d'eIF3 qui fait le lien entre 43S et eIF4F, et de la petite sous-unité ribosomale.

Le complexe d'initiation scanne l'extrémité 5'UTR du messenger jusqu'à atteindre le codon AUG initiateur. Lorsque l'AUG est reconnu, le GTP associé à eIF2 est hydrolysé, les facteurs d'initiation sont relargués et la grande sous-unité ribosomale s'associe à la petite sous-unité. La formation du monosome permet le début de la synthèse protéique. La

traduction est considérée comme active lorsque plusieurs ribosomes sont fixés sur le même messager, ce qu'on appelle les polysomes (**Figure. 5**).

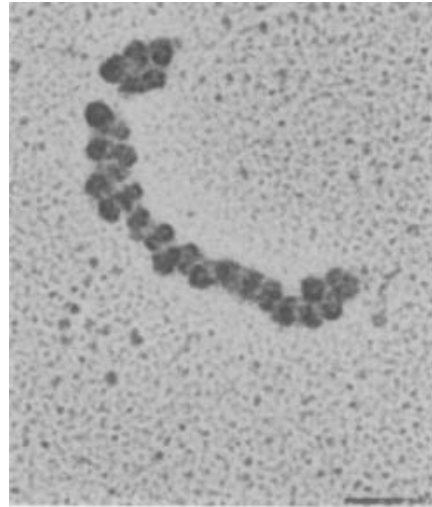


Figure 5 : Observation d'un polysome par microscopie électronique à transmission. Il s'agit d'un polysome d'embryon d'oursin, observé une heure après la fécondation. (Echelle : 0.1 μ m). Photographie issue de (Martin and Miller, 1983).

2.2. Régulation de l'initiation

La régulation de l'initiation de la traduction peut jouer sur l'activité des facteurs d'initiation de la traduction ou sur l'accessibilité de l'ARNm à la machinerie de traduction. Seront présentés ci-dessous les régulations des facteurs de l'initiation, les voies de signalisation impliquées, et enfin quelques motifs *cis*-régulateurs portés par l'ARNm responsables de régulations traductionnelles. Cela permettra de rappeler les régulations traductionnelles majeures de l'étape d'initiation, et d'avoir ainsi une vue d'ensemble de l'important niveau de complexité mis en place par la cellule pour la régulation traductionnelle de l'expression des gènes.

2.2.1. Régulation des facteurs d'initiation

L'ensemble des facteurs de traduction sont régulés, que ce soit par des modifications post-traductionnelles ou sous l'action d'autres protéines (revu dans (Jackson et al., 2010)).

Nous allons à présent nous intéresser aux régulations des facteurs d'initiation ayant un rôle majeur dans l'étape d'initiation de la traduction.

2.2.1.1. Régulation d'eIF2

eIF2 est composé de trois sous-unités : α , β et γ . eIF2 γ porte deux sites de liaison, l'un pour le GTP, le second pour le Met-ARNt_i^{Met}. eIF2 β est la sous-unité capable de lier l'ARNm. Les deux sous-unités γ et β interagissent avec eIF2B (échangeur GDP-GTP) et eIF5 (activateur de GTPase). Elles forment la partie effectrice de la protéine. Le couplage d'eIF2 au GTP est l'une des principales régulations de l'initiation de la traduction. A la fin de l'initiation, eIF2 est relargué sous forme inactive d'eIF2-GDP. Pour être réactivé, il doit être rechargé en GTP grâce au facteur d'échange eIF2B.

La sous-unité α est quant à elle régulatrice. Lorsqu'elle est phosphorylée sur la sérine 51, elle séquestre eIF2B, qui est limitant par rapport à eIF2, et bloque la réaction d'échange du GDP en GTP, inhibant ainsi la formation du complexe ternaire eIF2-GTP-Met-ARNt_i^{Met} et donc l'initiation de la traduction (**Figure. 6**).

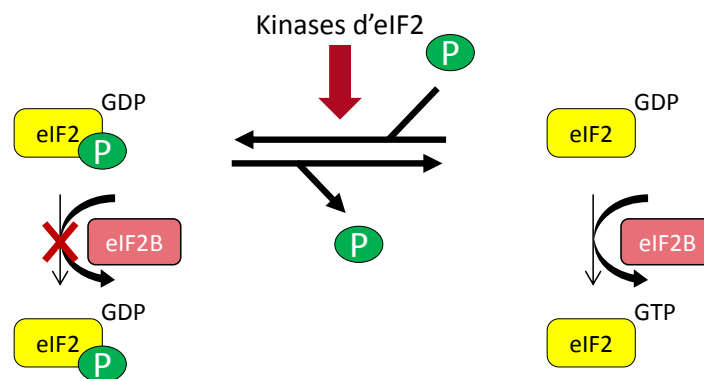


Figure 6 : Régulation de la formation du complexe ternaire. La phosphorylation d'eIF2 sur sa sous-unité α empêche l'échange de GDP en GTP. La déphosphorylation permet à eIF2B de recharger eIF2 en GTP, ce qui est nécessaire à la formation du complexe ternaire.

Chez les mammifères, il existe quatre protéines kinases capables de phosphoryler eIF2 α (Holcik and Sonenberg, 2005), qui diffèrent par leur domaine effecteur et leur mode d'activation.

- GCN2 (*General Control Nonderepressible 2*) est activée par la carence en acides aminés (conduisant à la présence d'ARNt déchargés), mais également par l'inhibition du protéasome ou les radiations UV. Elle est retrouvée chez tous les eucaryotes.
- HRI (*Heme Regulated Inhibitor kinase*), est activée par le stress oxydatif, par choc thermique ou par une carence en hème. Cette deuxième kinase est présente chez tous les vertébrés, mais également chez certains autres métazoaires et chez les levures.
- PKR (*Protein Kinase R*) est activée par la présence d'ARN double brins, soit lors d'infections virales. Comme HRI, PKR est présente chez tous les vertébrés.
- PERK (*PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase*) est activée en cas de stress lié au réticulum endoplasmique, de protéines mal repliées, ou encore en cas d'hypoxie. PERK est retrouvée chez l'ensemble des métazoaires.

Les modes d'activation des kinases d'eIF2 α sont extrêmement variables. Cela permet à la machinerie traductionnelle de répondre à une palette très différente de stress grâce au seul effecteur eIF2, conduisant à un contrôle efficace de la synthèse protéique.

En limitant la disponibilité du complexe ternaire, la régulation d'eIF2 provoque une inhibition de la synthèse protéique globale, mais également une augmentation de la traduction de certains messagers spécifiques, en particulier ceux portant des uORFs (*upstream Open Reading Frames*), petits cadres ouverts de lecture en 5'UTR de l'ORF principal. Parmi l'ensemble des transcrits présents dans les cellules humaines ou murines, l'analyse du génome a permis de déterminer que 35 à 49% des transcrits portent des uORFs (Iacono et al., 2005).

Dans un contexte de croissance cellulaire favorable, le complexe d'initiation de la traduction scanne la région 5'UTR du messager, atteint le codon AUG du premier uORF, et traduit le peptide codé par cette séquence. A la fin de l'initiation, le complexe ternaire eIF2-GDP-Met-ARNt_i^{Met} (inactif) est relargué et le ribosome synthétise le peptide codé par l'uORF. A l'atteinte du codon stop, seule la grande sous-unité du ribosome est relarguée, tandis que la petite sous-unité ribosomale continue de scanner l'ARNm jusqu'à être rechargé en eIF2-GTP-Met-ARNt_i^{Met} (actif), ce qui est l'une des caractéristiques de la traduction des uORFs. Dès lors, la traduction de l'uORF suivant est possible, et ce cycle se répète pour

chaque nouvel uORF. Les uORFs présentent la particularité d'empêcher la réinitiation à l'ORF principal ; soit ils contiennent un stretch de GC qui favorise la dissociation des deux sous-unités ribosomales, soit ils chevauchent l'ORF principal (revu dans (Holcik and Sonenberg, 2005)).

Dans un contexte de croissance cellulaire défavorable, eIF2 α est phosphorylée et la disponibilité en complexe ternaire est faible. La probabilité pour que le 40S soit rechargé en eIF2-GTP-Met-ARNt_i^{Met} avant d'atteindre le codon AUG de l'uORF suivant est faible. En revanche, le temps de scanner toute la région 5'UTR de l'ARNm, la probabilité pour qu'un complexe ternaire actif finisse par se fixer au 40S augmente, favorisant la traduction de l'ORF principal. Ainsi, malgré une inhibition globale de la synthèse protéique, la phosphorylation d'eIF2 α favorise la traduction de l'ORF principal des messagers portant des uORFs.

Le transcrit GCN4 (*General Control Nonderepressible 4*) de levure qui porte quatre uORFs est l'un des deux exemples que je détaillerai pour illustrer ce mécanisme (**Figure. 7**). GCN4 porte quatre uORFs en amont de l'ORF principal. L'uORF4 de GCN4 porte un stretch de GC, qui favorise la dissociation des deux sous-unités ribosomales, et donc empêche la réinitiation à l'ORF principal. En cas de carence en acides aminés, la kinase d'eIF2 α GCN2 est activée. La traduction globale est inhibée, mais la traduction de GCN4 est stimulée. L'ORF principal de GCN4 favorise la biosynthèse d'acides aminés, en réponse à la carence cellulaire et à l'activation de GCN2. (Pour revue (Hinnebusch, 2005).)

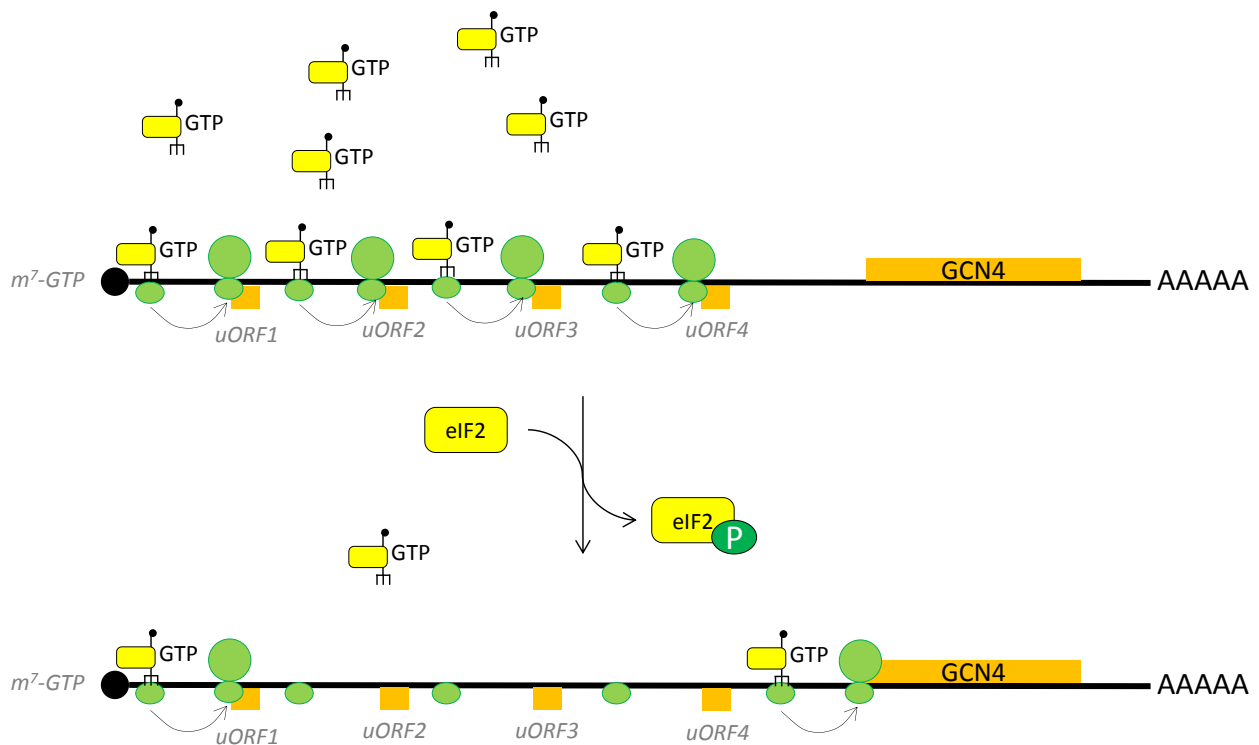


Figure 7 : Régulations de l'expression de GCN4 par les uORFs. Lorsque *eIF2α* n'est pas phosphorylée, le complexe ternaire est abondant et l'initiation se fait correctement à chaque uORF. En revanche, la réinitiation au niveau de l'ORF principal se fait difficilement parce que l'uORF4 favorise la dissociation du 40S et de l'ARNm. En cas de carence en acides aminés, *eIF2α* est phosphorylée, diminuant la quantité de complexes ternaires disponibles. De ce fait, la probabilité qu'il y ait réinitiation à l'uORF4 diminue, favorisant l'initiation à l'ORF de GCN4.

Mon deuxième exemple est le facteur de transcription ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*) de mammifère qui porte deux uORFs, dont le second chevauche l'ORF principal (**Figure. 8**). En cas de stress cellulaire, en particulier en cas de stress du réticulum endoplasmique lié à la présence de protéines mal repliées, la kinase PERK activée phosphoryle *eIF2α* ce qui favorise la traduction de l'ORF principal d'ATF4. Ce facteur de transcription est un facteur activateur des gènes de réponse aux protéines mal repliées. La traduction d'ATF4 permet un retour à l'état d'équilibre. (Pour revue (Kilberg et al., 2009).)

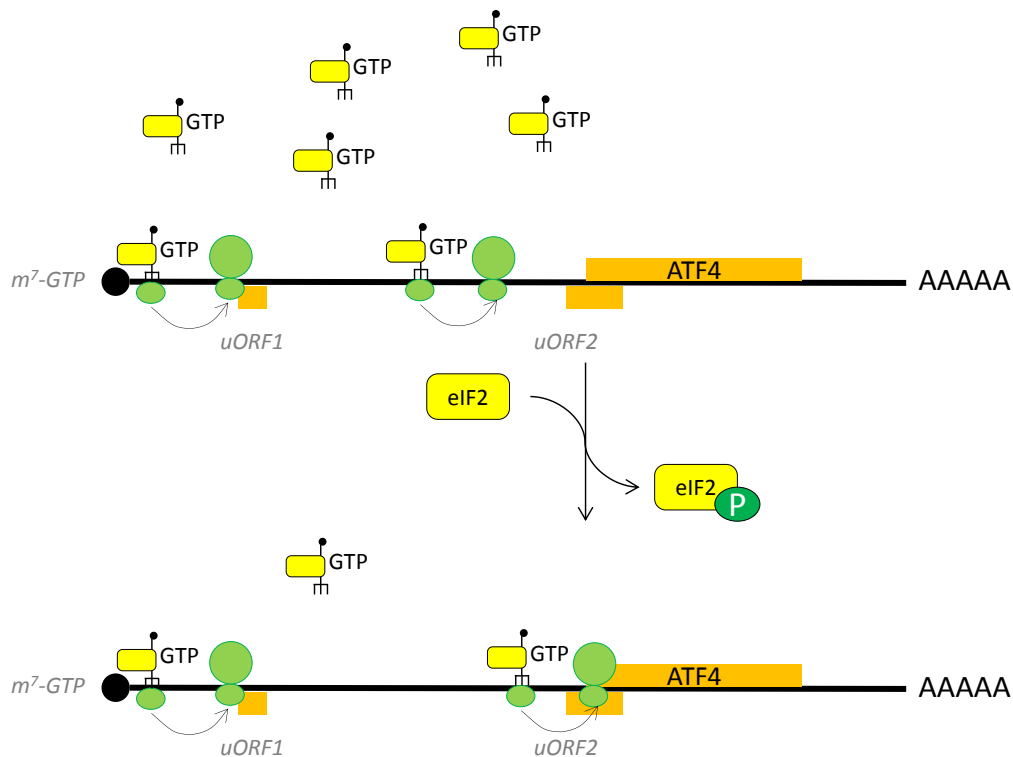


Figure 8 : Régulations de l'expression d'ATF4 par les uORFs. A l'instar de GCN4, l'abondance du complexe ternaire favorise la réinitiation aux deux uORFs d'ATF4. La réinitiation au niveau de l'ORF principal ne se fait pas, parce que l'uORF2 chevauche l'ORF principal. En cas de stress du réticulum endoplasmique, eIF2 α est phosphorylée, diminuant la quantité de complexes ternaires disponibles. La probabilité qu'il y ait réinitiation à l'uORF2 diminue, favorisant l'initiation à l'ORF d'ATF4.

2.2.1.2. Régulation d'eIF4E

2.2.1.2.1. Intérêt de la régulation d'eIF4E

Le facteur d'initiation eIF4E fait l'objet de nombreuses études depuis qu'il a été identifié, en 1978 dans un lysat de réticulocytes de lapin, par sa capacité de liaison à la coiffe de l'ARNm (Sonenberg et al., 1978). La protéine eIF4E est extrêmement conservée dans l'évolution, de la levure jusqu'aux mammifères.

La biodisponibilité d'eIF4E impacte particulièrement la traduction de messagers présentant une région 5'UTR structurée, nécessitant l'activité hélicase du complexe eIF4F. La traduction de tels messagers est peu efficace lorsqu'eIF4E est exprimé à des taux normaux, et est potentialisée par une importante quantité d'eIF4E (revu dans (De Benedetti and Harris, 1999)). Ces ARNm sont souvent des proto-oncogènes, impliqués dans le cycle et la

prolifération cellulaire (cycline D1, c-Myc), l'angiogenèse (VEGF, FGF2) ou la survie (Mcl-1, Bcl2) (Mamane et al., 2007).

Il a été montré chez des souris transgéniques surexprimant eIF4E que les animaux développent différents types de tumeurs (lymphomes, adénocarcinomes, angiosarcomes, *etc.*) (Ruggero et al., 2004). Chez l'homme la surexpression d'eIF4E est également associée à la tumorigenèse, à l'agressivité de la maladie et à un mauvais pronostic (revu dans (Hsieh and Ruggero, 2010)). eIF4E favorise la prolifération cellulaire et sa surexpression est suffisante pour provoquer la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse (Lazaris-Karatzas et al., 1990), de ce fait eIF4E est lui-même considéré comme un proto-oncogène. La forte implication d'eIF4E dans le processus de cancérisation en fait une cible très étudiée pour la compréhension du lien entre régulation traductionnelle et prolifération cellulaire.

De manière intéressante, une réduction d'expression de 90% de la protéine eIF4E par shRNA dans des cellules en culture ne modifie pas le taux de synthèse protéique globale (Yanagiya et al., 2012). Dans l'embryon de souris, la quantité d'eIF4E naturellement présente n'est pas limitante puisque seuls 50% de la quantité initiale d'eIF4E sont suffisants pour le maintien du développement et la vie de l'individu adulte (Truitt et al., 2015). Cela va à l'encontre de la notion de facteur limitant communément admise (Koromilas et al., 1992). Cependant, l'excès d'eIF4E observé permet une meilleure réponse au stress : les embryons dans lesquels la quantité d'eIF4E a été diminuée de moitié y répondent moins bien, et développent plus de tumeurs que les embryons contrôles.

Je détaillerai trois régulations du facteur eIF4E : régulation par inhibition compétitive pour la formation du complexe eIF4F, par modification post-traductionnelle, et enfin régulation en fonction de la classe de l'eIF4E. En effet, eIF4E se décline en trois classes de protéines dont l'expression est spécifique d'un tissu ou de certaines conditions physiologiques/physiopathologiques.

2.2.1.2.2. Régulation d'eIF4E par la protéine 4E-BP

La formation du complexe eIF4F dépend de la disponibilité du facteur d'initiation eIF4E. En condition favorable de traduction, eIF4E se lie à la protéine plateforme eIF4G pour former le complexe eIF4F. La régulation de la formation du complexe eIF4F a lieu par séquestration d'eIF4E par la petite protéine inhibitrice 4E-BP (*eIF4E-Binding Protein*).

Chez les mammifères, il existe trois 4E-BP (4E-BP1, 4E-BP2 ou 4E-BP3), qui ont toutes la capacité de lier eIF4E (Joshi et al., 2004). Malgré une présence ubiquitaire des trois transcrits de 4E-BP, certains tissus expriment plus spécifiquement l'une ou l'autre forme. Dans les cellules pancréatiques et adipeuses par exemple, 4E-BP1 est la forme prédominante. Dans les cellules cérébrales, c'est 4E-BP2 qui est essentiellement retrouvée. Enfin, 4E-BP3 est la forme majoritaire dans les cellules coliques et cardiaques (Poulin et al., 1998; Tsukiyama-Kohara et al., 2001). Les 4E-BP possèdent une séquence consensus YX₄LΦ (ou Φ est un acide aminé aromatique) (Mader et al., 1995) permettant la liaison à eIF4E. Cette séquence est également portée par eIF4G et les autres 4E-IPs (*eIF4E Interacting Proteins*) (Rhoads, 2009). Des études plus récentes montrent qu'en plus du motif YX₄LΦ, des fragments en *N*-terminal et en *C*-terminal sont impliqués dans la liaison de 4E-BP et des autres 4E-IPs avec eIF4E (Gosselin et al., 2011; Peter et al., 2015).

4E-BP porte quatre sites de phosphorylation très conservés, sur des résidus sérine ou thréonine (Ser65, Thr37, Thr46 et Thr70), qui sont les cibles de la voie de signalisation mTOR (*mammalian ou mechanistic Target Of Rapamycin*) (von Manteuffel et al., 1996). Les phosphorylations de 4E-BP sont nécessaires à la libération d'eIF4E, mais ne sont pas suffisantes (Gingras et al., 1998; Morita et al., 2012; Oulhen et al., 2009). 4E-BP hypophosphorylé peut lier eIF4E, de ce fait eIF4E n'est plus disponible pour son partenaire eIF4G, et la traduction globale est inhibée. A l'inverse, 4E-BP hyperphosphorylé est soumis à un changement de conformation ne lui permettant plus l'interaction avec eIF4E (Bah et al., 2014), qui est alors libre pour s'associer à eIF4G (**Figure. 9**).

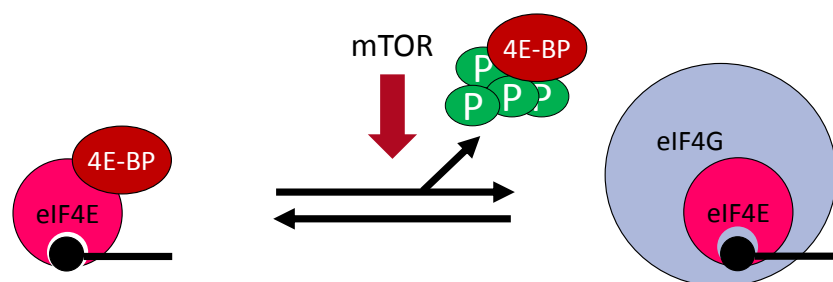


Figure 9 : Régulation de la formation du complexe eIF4F par 4E-BP. La séquestration d'eIF4E par 4E-BP empêche son association à eIF4G. La phosphorylation de 4E-BP par la voie mTOR libère eIF4E, alors disponible pour s'associer à eIF4G et former le complexe eIF4F.

L'action de la voie mTOR sur le niveau de phosphorylation de 4E-BP est une réponse à différents stimuli affectant la cellule : la disponibilité en acides aminés, le stress, et la présence d'hormones ou de facteurs de croissance extracellulaires. L'utilisation d'inhibiteurs de la voie mTOR, ou l'induction de l'expression de 4E-BP en cas de prolifération cellulaire non-contrôlée, permet un maintien de l'inhibition médiée par 4E-BP, et en conséquence un meilleur effet antiprolifératif (Jiang et al., 2003). A l'inverse d'eIF4E (proto-oncogène, (Lazaris-Karatzas et al., 1990)), 4E-BP est considéré comme un anti-oncogène puisque sa surexpression est capable d'inverser le phénotype cancéreux induit par la surexpression d'eIF4E (Rousseau et al., 1996).

2.2.1.2.3. Régulation d'eIF4E par phosphorylation

Chez les mammifères, lorsqu'il n'est pas séquestré par 4E-BP, eIF4E peut être phosphorylé par la kinase Mnk sur sa sérine 209 (Wang et al., 1998). Mnk est une enzyme effectrice en aval de la voie MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), qui est recrutée par eIF4G pour phosphoryler eIF4E (Pyronnet et al., 1999). eIF4E est phosphorylé sous l'effet de facteurs de croissance, d'hormones, ou encore lors de stress cellulaires. La phosphorylation d'eIF4E est corrélée avec le niveau de traduction, et la prolifération cellulaire. En revanche, la déphosphorylation a lieu en cas de carence en acides aminés, d'infection virale ou d'arrêt du cycle cellulaire (phase G0 du cycle) (revu dans (Scheper and Proud, 2002)).

La phosphorylation d'eIF4E sur la Ser209 n'influe pas sur la liaison eIF4E/4E-BP, mais provoque une diminution de l'affinité de la protéine pour la coiffe de l'ARNm, allant même jusqu'à déplacer l'équilibre en faveur de leur dissociation (Scheper et al., 2002). Les auteurs ont émis l'hypothèse que grâce à cette phosphorylation, eIF4E ne reste pas figé à la coiffe des ARNm, et se dissocie pour pouvoir se fixer sur d'autres messagers, notamment en réponse à diverses stimulations (mitogènes, facteurs de croissance, *etc.*), suggérant que la phosphorylation joue un rôle dans la traduction d'un ensemble d'ARNm. En accord avec cette hypothèse, une étude comparant le recrutement polysomal en fonction de la phosphorylation d'eIF4E a montré que la phosphorylation de la Ser209 favorise la traduction de proto-oncogènes, sans aucune variation de la quantité d'eIF4E (Furic et al., 2010). Parmi les messagers recrutés, les auteurs ont notamment identifié des chimiokines, des métalloprotéases, des anti-apoptotiques ou encore des facteurs de croissance, tous impliqués dans la progression et l'invasion tumorales ainsi que dans la formation de métastases.

2.2.1.2.4. Familles d'eIF4E

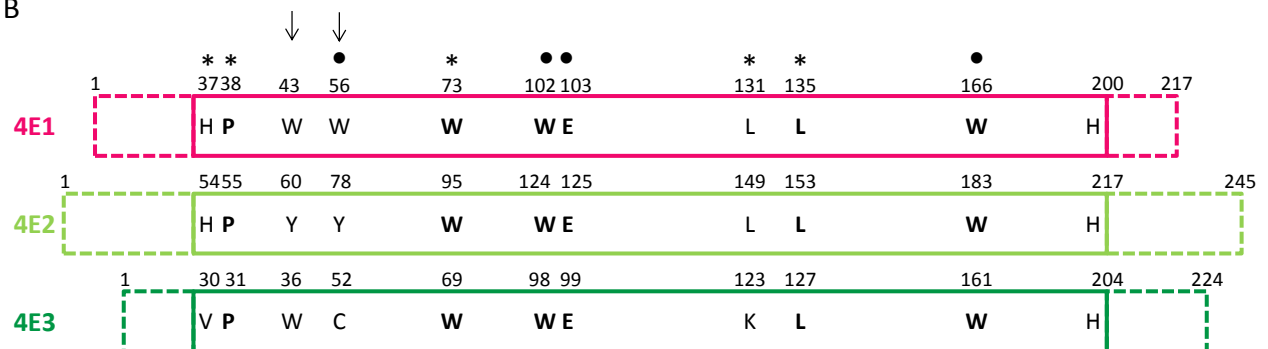
Il existe trois classes d'eIF4E (eIF4E1, eIF4E2 et eIF4E3), qui partagent 30% d'identité et qui sont très conservées au cours de l'évolution, de la levure aux mammifères (Joshi et al., 2005). Les trois classes diffèrent par leur distribution au sein des espèces, par leur expression au sein d'un organisme et par leur capacité à interagir avec la coiffe, eIF4G et 4E-BP (**Figure. 10**).

A

	Gène	Interactions			Expression	Rôle	Conservation	Ex. de cibles	Références
		Coiffe	eIF4G	4E-BP					
Protéines de liaison à la coiffe	eIF4E1*	+++	+++	+++	Ubiquitaire et continue	Facteur général de traduction	Eucaryotes	Oncogène (5' UTR structurée)	Jackson et al., 2010 Mamane et al., 2006
	eIF4E2	+	/	+/-	Hypoxie, stress, développement	Traduction sélective	Métazoaires	EGFR	Morita et al., 2012 ; Uniacke et al., 2012
	eIF4E3	+	+/-	/	Tissu spécifique, apoptose	Traduction sélective	Deutérostomes	Cdt1	Landon et al., 2014

* Facteur d'initiation canonique du complexe eIF4F

B



C

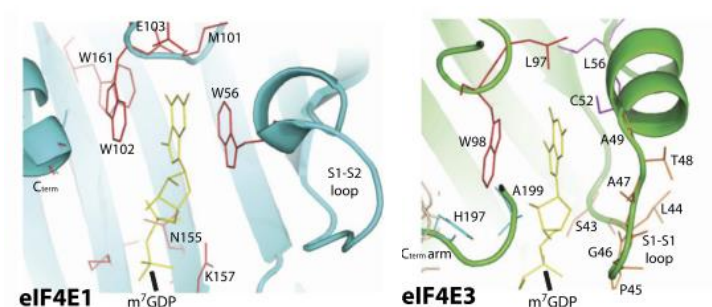


Figure 10 : Caractéristiques des trois eIF4E. (A) Tableau récapitulatif des caractéristiques des trois eIF4E. (B) Représentation schématique des homologies entre les trois eIF4E. Les * correspondent aux résidus impliqués dans la liaison à eIF4G ou 4E-BP, et les • aux résidus impliqués dans la liaison à la coiffe. Les flèches indiquent les sites permettant la classification selon (Joshi et al., 2004). La zone en trait plein correspond à la région conservée entre les trois classes. (C) Modélisation de la liaison à la coiffe par eIF4E1 ou eIF4E3 (issue de Osborne et al., 2013).

Classiquement, dans la plupart des publications concernant l'étude de la régulation traductionnelle, « eIF4E » fait référence à eIF4E1, considéré comme le facteur canonique de l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe. C'est le cas des études de la régulation d'eIF4E citées précédemment. Cependant, l'intérêt pour les deux autres eIF4E ne cesse de croître en raison de leur implication dans des régulations spécifiques. Je vais à présent détailler les différentes interactions et caractéristiques d'expression d'eIF4E2 et eIF4E3 (**Figure. 10**).

2.2.1.2.4.1. eIF4E2

eIF4E2 lie la coiffe m⁷-GTP de l'ARNm (Joshi et al., 2004), mais avec une affinité bien plus faible qu'eIF4E1 (Zuberek et al., 2007). D'autre part, eIF4E2 ne semble pas être capable de lier eIF4G *in vitro* (Joshi et al., 2004). En effet, les auteurs ne sont pas parvenus à co-purifier les deux protéines. Le même résultat est observé chez les mammifères *in vivo* (Uniacke et al., 2012). Si eIF4E2 ne peut se lier à eIF4G, la protéine est néanmoins capable de se fixer aux trois isoformes de la protéine inhibitrice 4E-BP (Joshi et al., 2004). Les auteurs soulignent cependant qu'eIF4E2 ne se fixe pas avec la même affinité sur les différents 4E-BP. Il semble qu'eIF4E2 se lie plus favorablement aux isoformes -2 et -3 de 4E-BP qu'à l'isoforme -1. Bien que la liaison eIF4E2-4E-BP ait été détectée *in vitro*, il semble que la liaison *in vivo* soit extrêmement faible (Joshi et al., 2005), voire indétectable (Rom et al., 1998).

Le rôle d'eIF4E2 sur l'activation ou la répression de la traduction n'est pas clairement établi. Un rôle physiologique des protéines eIF4E2 comme répresseurs de traduction d'ARNm spécifiques impliqués dans le développement embryonnaire a été montré chez la drosophile et les mammifères (Cho et al. 2005; Morita et al, 2012). Dans ce cas, eIF4E2 entre en compétition avec eIF4E1. La sélectivité d'eIF4E2 fait intervenir des protéines de liaison à l'ARN : Bicoid chez la drosophile (Cho et al., 2005) et GIGYF2 chez les mammifères (Morita et al., 2012), qui permettent d'augmenter l'affinité d'eIF4E2 pour la coiffe et de séquestrer le messager.

Il a récemment été montré qu'eIF4E2 remplace le facteur canonique eIF4E1 pour le maintien d'une traduction spécifique pendant l'hypoxie, condition dans laquelle la traduction globale est inhibée en réponse au manque d'oxygène (Uniacke et al., 2012; Uniacke et al., 2014). eIF4E2 forme un complexe avec RBM4 (*RNA-Binding Motif protein 4*) et HIF2 α (*Hypoxia Inducible Factor 2 α*), qui se lie aux ARNm portant des domaines HRE (*Hypoxia*

Response Element) en 3'UTR. Ce complexe recrute l'hélicase eIF4A, facilitant le déroulement des structures complexes souvent présentes en 5' des messagers impliqués dans la prolifération. Les ARNm ciblés sont par exemple les récepteurs à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), au PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) ou à l'IGF (*Insulin-like Growth Factor*), tous trois impliqués dans la réponse adaptative à l'hypoxie, dans le développement et dans la tumorigénèse (Uniacke et al., 2012). En condition normoxique, et contrairement à eIF4E1, eIF4E2 n'est pas capable d'induire la prolifération cellulaire (Joshi et al., 2004). Les cellules adaptent donc leur mode de traduction en fonction de la disponibilité en oxygène, provoquant un switch d'eIF4E1 en normoxie vers eIF4E2 en hypoxie. Ce mécanisme permet une traduction sélective d'ARNm au sein des cellules tumorales qui, dans le cœur de la tumeur sont en condition hypoxique.

eIF4E2 dirige une traduction sélective dépendante de la coiffe. La faible affinité d'eIF4E2 pour 4E-BP en condition physiologique implique que l'inhibition de la voie mTOR n'ait pas d'effet sur cette traduction (Uniacke et al., 2012). Les auteurs suggèrent que la résistance tumorale observée, malgré un traitement par la rapamycine soit la conséquence de la traduction dépendante d'eIF4E2.

2.2.1.2.4.2. eIF4E3

eIF4E3 est capable de lier la structure m⁷-GTP (Joshi et al., 2004) avec une affinité nettement moindre qu'eIF4E1 (Osborne et al., 2013). Les affinités d'eIF4E2 et d'eIF4E3 pour la coiffe sont équivalentes, bien qu'eIF4E3 n'utilise pas les mêmes interactions biophysiques qu'eIF4E1 et eIF4E2. Ces derniers reconnaissent la coiffe m⁷-GTP (chargée positivement) par l'intermédiaire des orbitales π des chaînes latérales de deux résidus tryptophanes (chargées négativement) (**Figure. 10C**). A défaut d'être prise en sandwich par les orbitales π de deux résidus tryptophanes, eIF4E3 utilise un autre arrangement spatial de plusieurs autres résidus, conférant la charge négative nécessaire à la fixation à la coiffe (Osborne et al., 2013). Ce sont les orbitales π du Trp98, et les oxygènes des résidus carbonyles des liaisons peptidiques des boucles S1 et S2 correctement orientés, qui apportent la densité électronique nécessaire à l'interaction avec la zone pauvre en électron de la coiffe. De plus, eIF4E3 peut former le complexe avec eIF4G *in vitro* (Joshi et al., 2004) comme *in vivo* (Landon et al., 2014). Ce facteur non-canonique peut donc initier la traduction dépendante de la coiffe. Cependant une étude récente remet en cause l'efficacité d'association d'eIF4E3 avec eIF4G (Osborne et al.,

2013). En revanche, eIF4E3 semble incapable de former un complexe eIF4E3-4E-BP, et ce, quelle que soit l'isoforme de 4E-BP testée (Joshi et al., 2004).

Le rôle d'eIF4E3 reste assez méconnu à l'heure actuelle. Son expression est tissu-spécifique (Joshi et al., 2004), le transcrit d'eIF4E3 est essentiellement retrouvé dans les muscles (cardiaque et striés squelettiques), mais il est également présent, en plus faible quantité, dans la rate et les poumons. Une telle expression localisée laisse penser que là encore, la protéine joue un rôle dans la traduction d'ARNm spécifiques. Cependant, les auteurs n'ont pas pu détecter la protéine eIF4E3 dans ces tissus. Ils suggèrent que l'expression serait trop faible pour être détectée, ou qu'elle soit effective dans des conditions particulières non étudiées.

La liaison atypique d'eIF4E3 à la coiffe, précédemment évoquée, est extrêmement importante pour sa fonction. eIF4E3 est capable, grâce à cette liaison, de contrecarrer les effets proto-oncogéniques d'eIF4E1 sur les mêmes cibles (VEGF, Cycline D1, c-Myc entre autres) (Osborne et al., 2013). Lorsque la coiffe d'eIF4E3 est mutée (Trp98>Ala), l'effet inhibiteur est perdu. La plus faible affinité d'eIF4E3 pour la coiffe observée *in vitro*, semble être compensée par la présence d'autres facteurs *in vivo*. Ces données suggèrent qu'eIF4E3 serait un anti-oncogène en compétition avec l'oncogène eIF4E1. L'hypothèse est renforcée par l'étude clinique, puisqu'en cas de leucémie myéloïde aigüe, où il y a une surexpression d'eIF4E1, les patients sous-expriment eIF4E3 et perdent ce mécanisme inhibiteur.

Une autre étude dans les cellules leucémiantes DLBCL (*Diffuse Large B-Cell Lymphoma* pour lymphome diffus à grandes cellules B), compare les rôles d'eIF4E1 et d'eIF4E3, et souligne l'importance de la phosphorylation d'eIF4E1 par Mnk pour la régulation traductionnelle et le contrôle de la prolifération (Landon et al., 2014). La phosphorylation d'eIF4E1 augmente son activité et diminue la probabilité d'utilisation d'eIF4E3. En revanche, l'inhibition de Mnk diminue l'efficacité d'initiation de la traduction d'eIF4E1, et conduit à l'augmentation de la traduction d'eIF4E3 ; la résultante étant une plus forte utilisation d'eIF4E3 en tant que protéine de liaison à la coiffe. L'analyse de la répartition des deux facteurs d'initiation dans un gradient de polysomes démontre la présence d'eIF4E3 dans les fractions légères du gradient, confirmant sa fonction de facteur d'initiation de la traduction. Le traductome dépendant d'eIF4E3 chevauche en grande partie celui d'eIF4E1. Cependant, la traduction de quelques messagers est plus spécifique de la présence de l'un ou

de l'autre. Cela a permis de montrer un enrichissement de motifs *cis*-régulateurs spécifiques du traductome d'eIF4E1 ou de celui d'eIF4E3.

En clinique, un moyen de contrecarrer l'effet oncogénique d'eIF4E1 serait d'agir sur son traductome. La traduction compensatoire médiée par eIF4E3 serait une solution. Elle pourrait, en plus de promouvoir une inhibition de la croissance cellulaire, favoriser un maintien de la viabilité cellulaire, sans prolifération rapide et incontrôlée. Néanmoins, eIF4E3 régule également des proto-oncogènes, et peut aussi être responsable de leur surexpression. Pour cette raison, le rôle de Mnk est crucial dans la balance eIF4E1/eIF4E3. Lorsque Mnk phosphoryle eIF4E1, cela inhibe la traduction d'eIF4E3, rendant son utilisation dans le complexe d'initiation peu probable (effet pro-oncogénique). En revanche, lorsque Mnk n'est pas active, eIF4E1 n'est pas phosphorylé, ce qui induit une surexpression d'eIF4E3. Cette surexpression augmente la probabilité qu'il se fixe à la coiffe des messagers, tandis que la probabilité qu'eIF4E1 se fixe diminue (effet anti-oncogénique) (**Figure. 11** et (Landon et al., 2014)).

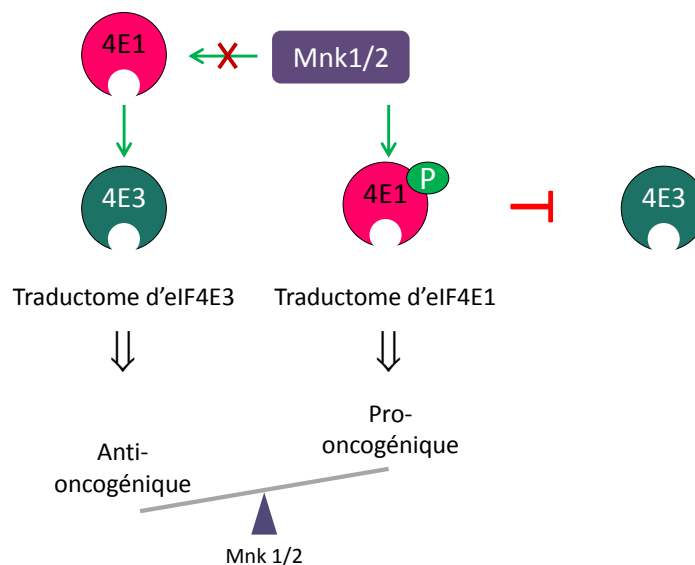


Figure 11 : Régulations d'eIF4E1 et eIF4E3 par les Mnk. La phosphorylation d'eIF4E1 par les Mnk induit une inhibition d'eIF4E3 et favorise le traductome pro-oncogénique d'eIF4E1. À l'inverse, lorsque les Mnk sont inactives, eIF4E1 n'est pas phosphorylé, ce qui stimule la traduction médiée par eIF4E3 et donc son traductome anti-oncogénique. D'après Landon et al., (2014).

Les particularités d'association des différents eIF4E avec la coiffe et leurs partenaires, ainsi que leur territoire et timing d'expression, suggèrent que chaque forme d'eIF4E joue un rôle spécifique en fonction de son expression et de ses interactants, et qu'elles ne sont pas fonctionnellement équivalentes.

2.2.1.3. Régulation d'eIF4G

eIF4G existe sous deux formes : eIF4GI et eIF4GII (**Figure. 12**). A l'instar d'eIF4E1, eIF4GI est considéré comme un facteur canonique du complexe d'initiation de la traduction. Ceci permet d'expliquer la simplification fréquente de la nomenclature, où « eIF4G » renvoie à eIF4GI.

Le facteur d'initiation eIF4G permet à un grand nombre de facteurs de traduction de se complexer. Sa région *N*-terminale lui permet de s'associer à PABP et à eIF4E ; sa région centrale permet la liaison avec eIF3 et eIF4A ; enfin, en *C*-terminale, eIF4G possède un second domaine de liaison à eIF4A et un domaine de liaison à Mnk pour la phosphorylation d'eIF4E (**Figure. 12**, et revu dans (Jackson et al., 2010)). En raison de ces nombreux sites d'interaction, eIF4G est décrite comme une protéine plateforme.

En cas d'infection par un poliovirus, eIF4G peut être clivé par des protéases. Le clivage a lieu entre le site de liaison d'eIF4E et celui d'eIF4A/eIF3. Lorsqu'eIF4G est clivé, il n'est donc plus capable d'assurer son rôle de protéine plateforme pour une traduction dépendante de la coiffe. Cependant, rien ne l'empêche de fixer eIF3 et eIF4A, et d'intervenir dans la traduction dépendante des IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) (Gingras et al., 1999).

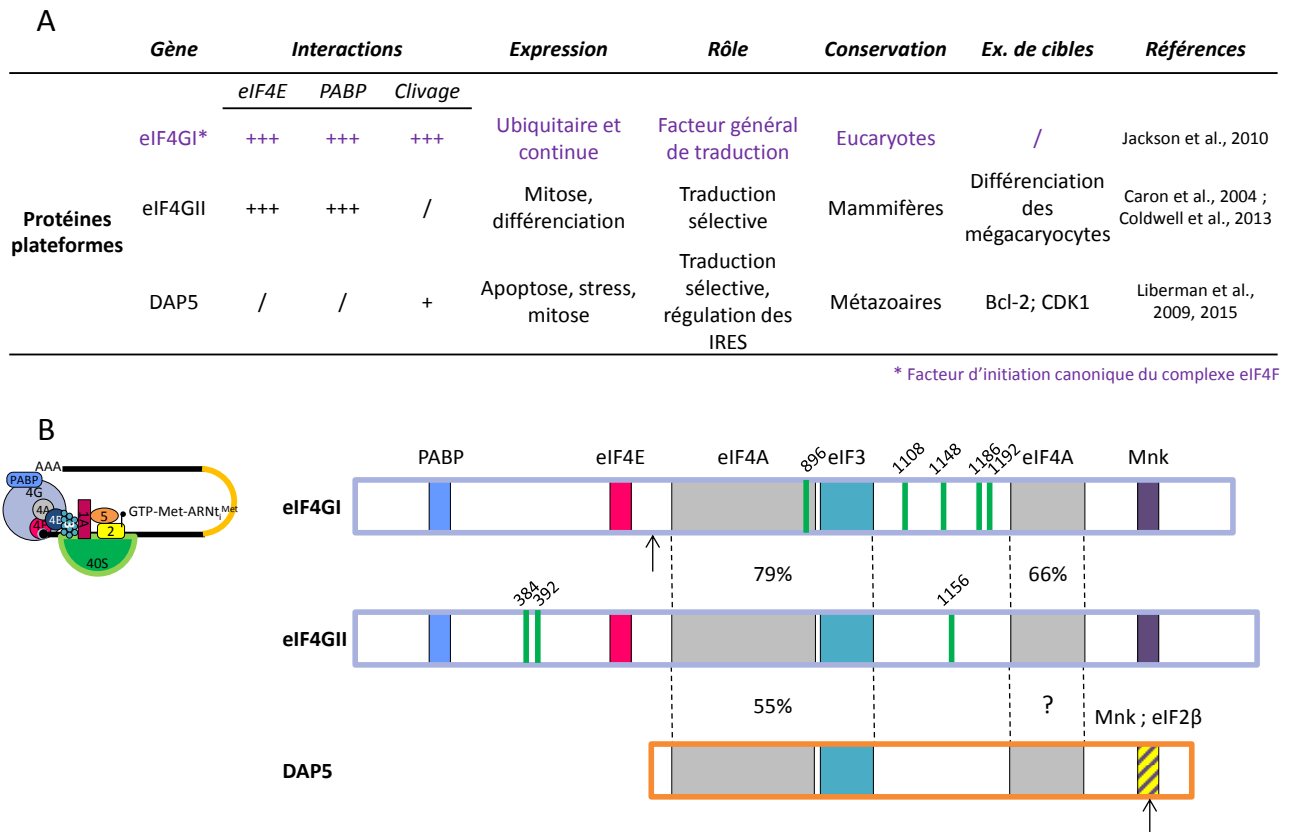


Figure 12 : Caractéristiques d'eIF4GI et de ses homologues. (A) Tableau récapitulatif des diverses caractéristiques d'eIF4GI et de ses homologues. (B) Représentation schématique des homologues entre eIF4GI, eIF4GII et DAP5. Les pourcentages d'identité sont ceux observés chez l'humain. Les sites de phosphorylations sont indiqués par une barre verte. Les sites de clivages sont indiqués par des flèches

- *Phosphorylations d'eIF4G*

eIF4GI porte trois sites de phosphorylation (Ser1108, Ser1148 et Ser1192 ; **Figure. 12**) dépendants de l'apport en nutriment, et sensibles à l'inhibition de la voie mTOR par la rapamycine. Cependant, après utilisation de mutants d'eIF4G tronqués dans leur partie N-terminale, les phosphorylations en C-terminales ne sont plus sensibles à la rapamycine. La région N-terminale d'eIF4GI modulerait ainsi l'accessibilité à la phosphorylation de la région C-terminale (par modification intramoléculaire ou intervention d'autres protéines) (Raught et al., 2000).

Plus récemment, un autre site de phosphorylation d'eIF4G a été identifié sur la Ser896 (**Figure. 12**). Cette phosphorylation est médiée par la kinase Pak2 (*p21-activated protein kinase 2*) (Ling et al., 2005). Pak2 est une kinase activée par des signaux de stress (apoptose,

lésion de l'ADN ou hyperosmolarité). Son activité est transitoire, à l'exception d'une activation par des signaux pro-apoptotiques, contexte dans lequel elle devient constitutivement active et promeut la mort cellulaire. En se liant au domaine régulateur de la GTPase Cdc42 (*Cell division control protein 42*), Pak2 tend à lever l'inhibition de division cellulaire médiée par ces différents stress (Ling et al., 2005; Roig et al., 2000). Pak2 se lie à eIF4G sur une région contenant le motif de liaison à eIF4E YX₄LΦ, et le phosphoryle. De ce fait, la phosphorylation d'eIF4G par Pak2 inhibe la traduction dépendante de la coiffe. En revanche, elle n'empêche pas la traduction dépendante des IRES (Ling et al., 2005).

Une quatrième phosphorylation d'eIF4G a lieu sur la Ser1186 ((Dobrikov et al., 2011) ; **Figure. 12**). Cette nouvelle phosphorylation implique une autre kinase en amont de la voie MAPK, la PKCα (*Protéine Kinase C α*). Lorsque la Ser1186 d'eIF4G est phosphorylée, la liaison à Mnk est favorisée, ce qui à son tour, augmente l'efficacité de phosphorylation d'eIF4E par Mnk.

- *eIF4GII*

eIF4GII est un homologue d'eIF4GI présentant 46% d'identité avec le facteur canonique chez les mammifères (Gradi et al., 1998). Les deux eIF4G ont les mêmes propriétés de liaison aux facteurs d'initiation et à Mnk (**Figure. 12**). En revanche, eIF4GII ne peut être clivé par les protéases lors d'infections virales (Ohlmann et al., 2002), suggérant une sélection différente des messagers. eIF4GII est impliqué dans la traduction sélective au cours de la différenciation cellulaire.

L'utilisation préférentielle d'eIF4GII sous l'effet de la thrombopoïétine a par exemple été démontrée au cours de la différenciation des mégacaryocytes, dans les cellules de mammifères (Caron et al., 2004). eIF4GII est également indispensable lors de la différenciation des spermatides chez la drosophile (Baker and Fuller, 2007). Les eIF4G portant des domaines de liaison à l'ARN, ceux d'eIF4GII pourraient être responsables de la traduction sélective (directement, ou indirectement par intervention d'autres partenaires) de messagers qui semblent coder pour des protéines de la différenciation cellulaire.

eIF4GI et eIF4GII sont phosphorylés par des kinases différentes, dans le cas d'eIF4GII, la phosphorylation sur la Ser1156 (**Figure. 12**) s'effectue par l'intermédiaire de la voie CaMK (Ca^{2+} /Calmoduline-dependent Kinases) (Qin et al., 2003).

La phosphorylation d'eIF4GII a longtemps été associée à une diminution de la traduction dépendante de la coiffe par baisse de l'association eIF4E/eIF4GII, notamment en mitose (Pyronnet et al., 2001). Actuellement, cette hypothèse est remise en question. Dans les neurones, la CaMK est activée lors de l'augmentation de l'activité neuronale (*i.e.* augmentation des connexions nerveuses et de la plasticité). La phosphorylation d'eIF4GII par la CaMK augmente son recrutement dans le complexe eIF4F, ce qui répond au besoin de néosynthèse protéique, en favorisant la traduction dépendante de la coiffe (Srivastava et al., 2012).

Deux nouveaux sites de phosphorylations spécifiques de l'isoforme eIF4GII ont été identifiés sur les Ser384 et Ser392 lors d'une étude du rôle d'eIF4GII dans la traduction, au cours de la mitose dans des cellules de mammifères (Coldwell et al., 2013). La kinase responsable de ces modifications post-traductionnelles semble être CDK1 (Cyclin-Dependant Kinase 1). Les auteurs démontrent que le taux de synthèse protéique n'est pas affecté lors de la mitose. Afin d'expliquer l'inhibition de synthèse protéique précédemment observée (Pyronnet et al., 2001), Coldwell et al. suggèrent que ce résultat était causé par le traitement prolongé par un antimitotique, provoquant un stress cellulaire. En effet, le traitement des cellules sur une courte durée ne permet pas cette observation. En revanche, l'étude ne permet pas de conclure sur l'utilisation préférentielle de l'une ou l'autre isoforme pour la formation du complexe d'initiation. Cela suggère que dans ces conditions, les deux eIF4G sont utilisés, avec probablement un recrutement d'eIF4GII pour la traduction de messagers spécifiques, comme il a déjà été observé dans (Baker and Fuller, 2007; Caron et al., 2004).

- *DAP5*

DAP5 (Death-Associated Protein 5) est un membre ubiquitaire de la famille des eIF4G impliqué dans l'apoptose, le stress du réticulum endoplasmique, ou la mitose. Comme les eIF4G, il se lie à eIF4A, eIF3 et Mnk, seulement il est incapable de se lier à eIF4E (**Figure. 12**) (Henis-Korenblit et al., 2000). L'activation de la protéine pro-apoptotique p53 active une cascade de caspases responsable du clivage de DAP5. Malgré ce clivage, les sites

de liaison à eIF4A et à eIF3 sont conservés. La forme native de DAP5 est présente dans les cellules en croissance, tandis que la forme clivée est plutôt retrouvée dans les cellules apoptotiques (Henis-Korenblit et al., 2000).

Dans les cellules apoptotiques, la traduction globale est fortement diminuée (de l'ordre de 60 à 70%) en raison du clivage d'eIF4GI et de la dégradation des deux eIF4G. La traduction résiduelle semble être le résultat d'une traduction alternative, indépendante de la présence d'eIF4G. Les auteurs suggèrent que DAP5 pourrait être à l'origine d'un complexe d'initiation alternatif, qui en séquestrant eIF4A et eIF3, empêcherait la formation du complexe 48S et l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe. Par extension, la traduction de proto-oncogènes en serait affectée. De manière intéressante, DAP5 régule la traduction dépendante des IRES. DAP5 s'autorégule d'une part, car il porte un IRES (Henis-Korenblit et al., 2000) ; et d'autre part, il est démontré qu'il favorise la traduction sélective de protéines pro-apoptotiques portant des IRES dans des cellules soumises à un stress du réticulum endoplasmique (Lewis et al., 2007).

Le rôle de DAP5 ne se limite pas à une réponse à divers stress cellulaires. En effet, il a une grande importance dans la survie des cellules en mitose (Lieberman et al., 2009; Marash et al., 2008). Son expression y est nécessaire pour la traduction indépendante de la coiffe de transcrits codant pour des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire (CDK1 et Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), portant tous deux des IRES en 5'UTR). En l'absence de DAP5, ces transcrits sont dérecrutés des polysomes et ne sont plus activement traduits, ce qui conduit les cellules à l'apoptose.

Une étude récente démontre que DAP5 est un activateur sélectif de la traduction indépendante de la coiffe (Lieberman et al., 2015). Pour la stimuler, DAP5 s'associe à deux facteurs d'initiation de la traduction, la sous-unité β d'eIF2, et eIF4A. Grâce à son interaction directe avec eIF2, DAP5 recrute le complexe ternaire, sans l'intervention d'eIF3, et permet son recrutement à l'IRES. La liaison à eIF4A quant à elle, favoriserait l'interaction de DAP5 avec l'IRES du messenger sélectionné. La traduction dépendante des IRES impliquerait donc un complexe alternatif composé de DAP5, d'eIF4A et d'eIF2 (**Figure. 13**).

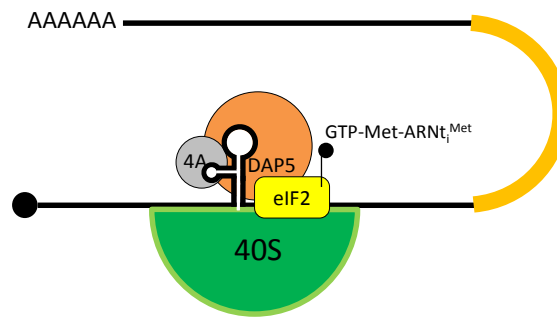


Figure 13 : Représentation schématique du complexe d'initiation alternatif DAP5-eIF4A-eIF2.

2.2.1.4. Régulation de PABP

La protéine PABP se lie à la queue poly(A) des ARNm et fait le lien entre les extrémités 5' et 3'UTR. Sa fixation protège l'ARN de la dégradation, facilite le recyclage du complexe d'initiation de la traduction et augmente son efficacité. La longueur de la queue poly(A) de l'ARNm détermine le nombre de protéines PABP liées à la coiffe. Outre sa fonction d'activateur global de la traduction, PABP potentialise aussi la traduction sélective d'ARNm portant des IRES.

Les régulateurs de PABP sont les PAIP (*PABP Interacting Proteins*) (**Figure. 14**), qui modulent son interaction avec eIF4G (Derry et al., 2006). Il s'agit d'une famille de protéines, constituée de PAIP1 et de PAIP2. PAIP1 stimule la traduction, tandis PAIP2 l'inhibe.

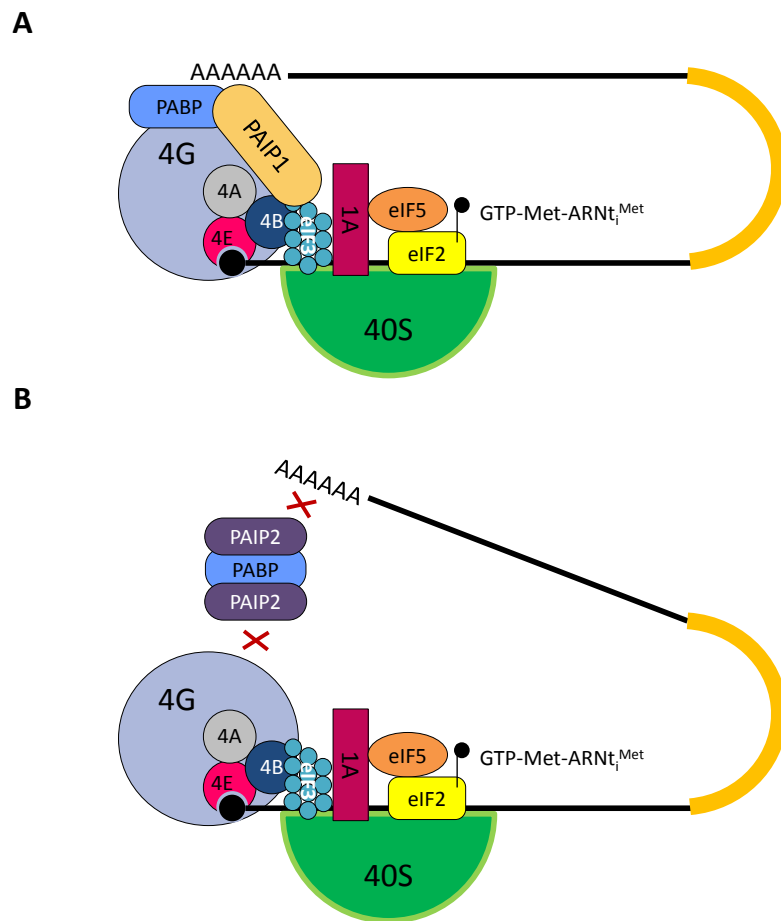


Figure 14 : Régulation de PABP par les PAIPs. (A) Lorsque PABP est associé à PAIP1, cela stimule l'initiation de la traduction en renforçant la liaison de PABP au complexe eIF4F. (B) L'association de PABP à PAIP2 empêche ses associations à la queue poly(A) et à eIF4G, ce qui a pour conséquence une inhibition de l'initiation de la traduction.

Derry et al. proposent un modèle où PAIP1, en plus de se lier à PABP, s'associe à eIF3 et eIF4A, ce qui stabilise le lien eIF4G-PABP. A ce jour, seule l'association à eIF3 a été démontrée (Martineau et al., 2008). PAIP2 est un compétiteur de PAIP1. Il empêche la liaison de PABP à la queue poly(A) et inhibe de manière compétitive l'interaction de PABP avec eIF4G de manière compétitive (Karim et al., 2006; Khaleghpour et al., 2001).

hnRNP-Q (*heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein-Q*) est un inhibiteur compétitif de PABP pour la liaison à la queue poly(A) des ARNm. En cas de déplétion de PABP, hnRNP-Q prend sa place par défaut (Svitkin et al., 2013). Bien qu'en condition normale, la concentration de hnRNP-Q soit supérieure à celle de PABP, l'affinité de hnRNP-Q pour la queue poly(A) est plus faible que celle de PABP. La présence majoritaire de hnRNP-Q en

condition physiologique reste donc insuffisante pour inhiber PABP. Pourtant, la déplétion de hnRNP-Q provoque une stimulation de la synthèse protéique globale, *in vitro* comme *in vivo*. hnRNP-Q diminue l'interaction d'eIF4E avec la coiffe de l'ARNm, ce qui perturbe la formation du complexe 48S. La quantité endogène de hnRNP-Q est donc suffisante pour avoir un effet régulateur sur la traduction globale. Outre sa propriété d'inhibition globale de la traduction, hnRNP-Q favorise la stabilité d'ARNm spécifiques et dans certains cas, leur traduction.

La déadénylation des ARNm médiée par les micros ARN par exemple, dépend en partie de l'interaction de PABP avec la queue poly(A) (Fabian et al., 2009). Le raccourcissement de la queue poly(A) conduit à l'inhibition de la traduction du messager ciblé, puis à sa dégradation. Or, hnRNP-Q inhibe la répression et la déadénylation dépendantes de PABP (Svitkin et al., 2013). Grâce à cette activité, mais également en favorisant la traduction de messagers portant des IRES cellulaires (Kim et al., 2010), viraux (Park et al., 2011) ou chimériques (Svitkin et al., 2013), hnRNP-Q favorise spécifiquement la traduction de messagers particuliers. De plus, il semblerait que hnRNP-Q intervienne dans la traduction lors de la transition G2/M du cycle cellulaire ou lors de différents stress (Kim et al., 2012; Quaresma et al., 2009). A l'image de DAP5 pour eIF4G, hnRNP-Q possède les propriétés suffisantes pour intervenir dans l'initiation de la traduction non-canonique en conditions particulières.

Exemple de Period1 et hnRNP-Q

Le gène *Period1* (*Per1*) est impliqué dans la régulation du rythme circadien. Un décalage entre l'accumulation de l'ARNm et celle de la protéine est observée dans les cellules (Lee et al., 2012). L'ARNm codant pour la protéine Per1 porte un IRES en 5'UTR sur lequel se lie spécifiquement hnRNP-Q. En l'absence de hnRNP-Q, l'ARNm de Per1 n'est plus associé aux polysomes actifs, et la synthèse de Per1 est inhibée. Enfin, la liaison de l'ARNm de Per1 et d'hnRNP-Q est rythmique et en phase avec le rythme circadien. L'IRES de Per1 et hnRNP-Q assurent donc une régulation temporelle de la traduction de Per1, nécessaire au maintien du cycle veille-sommeil.

2.2.1.5. Régulation d'eIF4A

La protéine eIF4A est une hélicase de l'ARN ATP-dépendante, dont le rôle est de dérouler les régions structurées en 5'UTR des ARNm, permettant ainsi une lecture plus aisée

de l'ARNm par le complexe d'initiation. Seule, la protéine est peu efficace, tant dans sa liaison à l'ARN que dans son activité hélicase. Son activité est potentialisée grâce à son association avec d'autres protéines : eIF4A s'associe à eIF4B et/ou à eIF4H (Rogers et al., 2001). eIF4B augmente fortement son activité hélicase, d'autant que les domaines d'interaction à l'ARN d'eIF4B stabilisent le complexe eIF4A-eIF4B-ARNm. En revanche, eIF4H ne possède qu'un seul domaine d'interaction à l'ARN, ce qui est insuffisant pour renforcer fortement la liaison à l'ARNm. L'association d'eIF4A à eIF4H n'augmente donc que faiblement son activité. La formation d'un complexe eIF4A-eIF4B-eIF4H augmente encore l'efficacité de l'hélicase. *A fortiori*, l'activité est maximale lorsqu'eIF4A s'associe à eIF4B, à eIF4H, et que l'hélicase est recrutée par eIF4G pour former le complexe eIF4F. La stabilité du complexe eIF4F est ainsi fortifiée puisque l'affinité de liaison à l'ARN est beaucoup plus importante que celle de la protéine eIF4A seule ((Rogers et al., 2001) et revu dans (Jackson et al., 2010)).

eIF4A est régulée négativement par l'anti-oncogène PDCD4 (*Programmed Cell Death protein 4*). En inhibant l'activité hélicase d'eIF4A, PDCD4 inhibe la traduction des proto-oncogènes contenant des régions 5'UTR structurées. PDCD4 contient deux domaines MA-3 capables d'interagir avec eIF4A. Cette double liaison de PDCD4 à eIF4A augmente considérablement la stabilité de leur association. PDCD4 et eIF4G, contenant tous deux les mêmes domaines MA-3, sont en compétition pour la liaison à eIF4A (Suzuki et al., 2008; Waters et al., 2011).

La lignée cellulaire MCF7 de cancer du sein contient un taux élevé d'eIF4A et bas de PDCD4. Dans ce modèle, la diminution de la quantité d'eIF4A par ARN interférent ou la surexpression de PDCD4 diminue la prolifération cellulaire (Modelska et al., 2015). eIF4A est spécifiquement responsable du recrutement polysomal de proto-oncogènes (protéines G, cyclines, ou Ser/Thr kinases). En revanche, en l'absence d'eIF4A, les transcrits surreprésentés dans les polysomes sont associés à des mécanismes antiprolifératifs (réparation de l'ADN ou apoptose).

D'autres travaux montrent que PDCD4 est également capable de s'associer directement à des proto-oncogènes, et d'inhiber leur traduction indépendamment d'eIF4A et ce, probablement au cours de l'élongation (Biyanee et al., 2014). Enfin, PDCD4 s'associe également à PABP (Fehler et al., 2014). L'interaction entre les deux protéines est directe au niveau de domaines de liaison à l'ARN, et se retrouve conservée dans l'évolution, des

insectes aux mammifères. La suppression de la traduction médiée par PDCD4 est dépendante de son interaction avec PABP. Les auteurs suggèrent que PABP serait un cofacteur de PDCD4 dans son rôle de régulateur d'oncogènes.

2.2.2. Voies de signalisation impliquées

La régulation de l'initiation de la traduction est souvent la conséquence de modifications post-traductionnelles de protéines intervenant dans le complexe d'initiation. L'essentiel de ces modifications post-traductionnelles sont des phosphorylations, faisant intervenir de nombreuses protéines kinases. Dans la cellule, deux voies de signalisation sont fortement impliquées dans la régulation traductionnelle par leurs cascades de protéines kinases : la voie FRAP/mTOR (*FKBP12 Rapamycin Associated Protein / [mammalian or mechanistic] Target Of Rapamycin*), plus communément nommée voie mTOR, et la voie MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), également connue sous le nom de voie Ras-Raf-Mek-Erk.

2.2.2.1. Voie mTOR

La voie mTOR est extrêmement conservée chez les eucaryotes. Elle est un régulateur clé du métabolisme, et en particulier un régulateur de la prolifération et de la croissance cellulaire. Cette voie est activée par la disponibilité en facteurs de croissance, en hormones, en cytokines, en acides aminés, et inhibée en cas d'hypoxie ou de stress. Une dérégulation de mTOR est souvent associée à des pathologies telles que le cancer ou le diabète. Son action sur la prolifération cellulaire est directement liée à son rôle fondamental dans le contrôle traductionnel. En effet, la voie de signalisation mTOR met en jeu une cascade de kinases, en amont et en aval de la protéine mTOR (Ser/Thr kinase), responsable du contrôle de la machinerie traductionnelle (d'eIF4E via 4E-BP, d'eIF4B, d'eIF4G, de facteurs d'élongation ou de composantes du ribosome). Elle établit ainsi un lien entre contrôle de la synthèse protéique et prolifération cellulaire (revu dans (Zoncu et al., 2011a)).

La kinase mTOR peut former les deux macro-complexes mTORC1 et mTORC2 (*mTOR Complex 1/2*, (Loewith et al., 2002)), selon que la kinase mTOR s'associe à Raptor (*Regulatory associated protein of mTOR*; (Kim et al., 2002)) ou à Rictor (*Rapamycin-insensitive companion of mTOR*; (Sarbasov et al., 2004)) (**Figure. 15**).

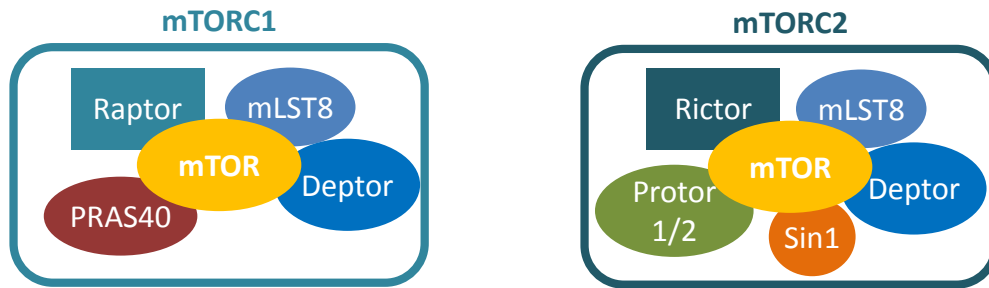


Figure 15 : Représentation schématique des deux complexes mTORC1 et mTORC2.

2.2.2.1.1. *mTORC1*

Le complexe mTORC1 peut être activé de deux façons distinctes. L'activation s'effectue par l'intermédiaire de la voie PI3K/Akt (1) ou par l'intervention de la V-ATPase (*Vacuolar H⁺-ATPase*) (2).

Dans le premier cas, l'activation de la PI3K par les facteurs de croissance (*via* des RTK (*Receptor Tyrosine Kinase*)) active PDK1, qui elle-même va activer Akt. Akt en inhibant le complexe TSC1/TSC2 active alors la kinase mTOR (**Figure. 16**).

Dans le second cas, la disponibilité en acides aminés active la V-ATPase lysosomale, qui active à son tour Ragulator, protéine d'échange de guanine (ou GEF pour *Guanine nucleotide Exchange Factor*). Les Rag-GTPases activées par Ragulator sont recrutées à la membrane lysosomale, où elles recrutent le complexe mTORC1. L'activité kinase de mTOR est alors activée par Rheb, une autre GTPase, sensible aux facteurs de croissance (Zoncu et al., 2011b) (**Figure. 16**).

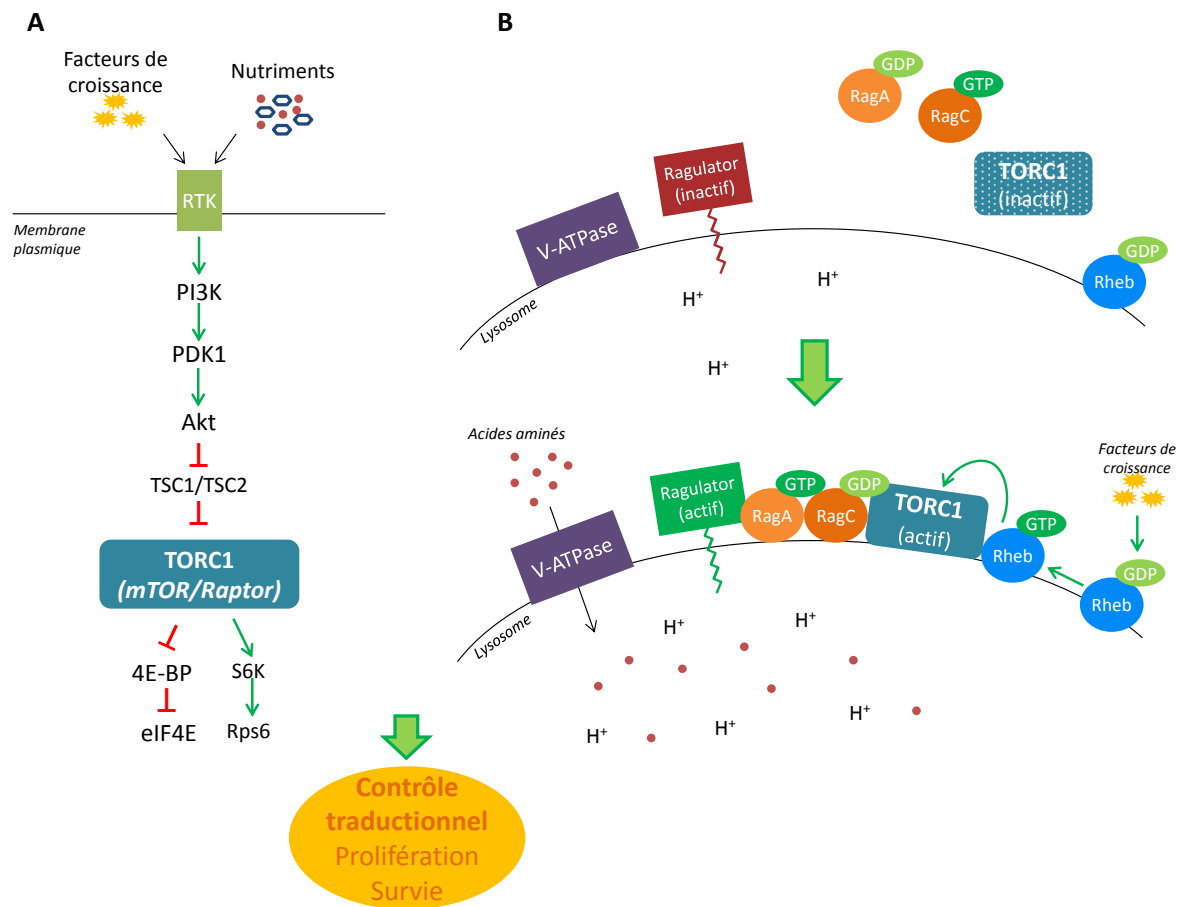


Figure 16 : Voie de signalisation mTOR et modes d'activation du complexe mTORC1. (A) Par l'intermédiaire de la PI3K. (B) Par l'intermédiaire de la V-ATPase. Les signaux activateurs sont représentés en vert, les signaux répresseurs en rouge.

Les cibles principales du complexe mTORC1 sont impliquées dans la traduction. Il s'agit d'une part de la petite protéine inhibitrice 4E-BP (von Manteuffel et al., 1996), régulatrice de la traduction dépendante de la coiffe, et de la protéine kinase S6 (S6K). L'activation de la S6K provoque la phosphorylation du facteur d'initiation eIF4B, ce qui potentialise son activité d'aide à l'hélicase eIF4A. Le facteur d'élongation eEF1A et la kinase d'eEF2, eEF2K sont d'autres substrats la S6K (revu dans (Fonseca et al., 2014)). Enfin et surtout, la S6K phosphoryle la protéine ribosomale Rps6 (*Ribosomal protein s6*), impliquée dans la biogenèse des ribosomes (Hannan et al., 2003).

Les cibles du complexe mTORC1 possèdent une petite séquence TOS (*TOR Signaling motif*) reconnue par Raptor. Cette reconnaissance médiée par Raptor est nécessaire à la phosphorylation. 4E-BP possède, en plus du motif TOS, un motif RAIP (Arg-Ala-Ile-Pro), nécessaire à sa phosphorylation par mTOR.

mTORC1 est capable d'interagir avec d'autres cibles impliquées dans la régulation traductionnelle, telles que la protéine LARP1, qui s'associe à PABP et régule la traduction des 5'TOP ARNm (Fonseca et al., 2015; Tcherkezian et al., 2014) ; ou la protéine IMP2 (*Insulin-like Growth Factor 2 [IGF2]-mRNA binding Protein 2*) qui augmente la traduction dépendante de l'IRES de l'IGF (Dai et al., 2011).

2.2.2.1.2. mTORC2

mTORC2 a été moins étudiée que mTORC1. Néanmoins, il est établi que l'activation de mTORC2 est dépendante de la présence de ribosomes aux membranes du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Zinzalla et al., 2011). La PI3K favorise l'association de mTORC2 aux ribosomes, suggérant que ce sont les ribosomes eux-mêmes qui activeraient mTORC2. Une forte quantité de ribosomes atteste d'un état de croissance cellulaire favorable. Le fait que l'activation de mTORC2 soit dépendante des ribosomes, garantit une activité restreinte aux cellules en croissance.

Par son association aux ribosomes, mTORC2 est capable d'assurer, au cours de la néosynthèse, la phosphorylation des peptides d'IMP1/3 (régulateurs de l'IGF2) et d'Akt (Dai et al., 2011; Oh et al., 2010). Ces phosphorylations ont pour conséquence une augmentation de l'activité de régulateurs positifs de l'oncogène IGF2, et la stabilisation de la protéine Akt. Le complexe mTORC2 agit doublement sur Akt car, en plus de stabiliser la protéine, il stimule son activité kinasique (Zinzalla et al., 2011). Akt se trouvant juste en amont de mTORC1, ce processus assure le rétrocontrôle positif d'un complexe sur l'autre. Ces deux exemples attestent le fait que mTORC2 soit impliqué dans la prolifération et la survie cellulaire.

2.2.2.2. *Inhibition de la voie mTOR*

La voie de signalisation mTOR est fortement impliquée dans la régulation de la synthèse protéique et, par extension, dans la prolifération cellulaire. Elle est souvent hyperactivée dans les cas de cancers, engendrant une inactivation de l'anti-oncogène 4E-BP et

une surexpression du proto-oncogène eIF4E (Zoncu et al., 2011a). De ce fait, de nombreuses études s'attachent à la compréhension des mécanismes de cette voie de signalisation, et s'intéressent à ses inhibiteurs, spécifiques d'un (ou des deux) complexe(s) (Alain et al., 2012; Malina et al., 2012).

La rapamycine est l'inhibiteur spécifique de mTORC1 le plus célèbre, car il a permis la découverte de la voie de signalisation (Brown et al., 1994; Heitman et al., 1991). La rapamycine agit en se fixant sur FKBP12, une protéine liant le complexe mTORC1 (Choi et al., 1996). La formation de ce dimère engendre un changement de conformation qui empêche l'interaction mTOR-Raptor (Kim et al., 2002). La rapamycine inhibe les phosphorylations de 4E-BP et de la S6K induite par mTORC1, en étant plus efficace pour la S6K (Choo et al., 2008). Cependant, un traitement prolongé à la rapamycine provoque une réapparition des phosphorylations de 4E-BP, entraînant une ré-augmentation de la synthèse protéique (Choo et al., 2008). En plus de la possible apparition d'une résistance au traitement, l'inhibition de mTORC1 provoque une activation de la voie MAPK, dans les cellules cancéreuses comme dans les cellules normales, en levant l'inhibition médiée par la S6K sur la PI3K (Carracedo et al., 2008).

La rapamycine et les rapalogues présentent l'inconvénient de ne pas supprimer l'activité kinasique de mTORC2. Etant donné les rétrocontrôles possibles, inhiber un seul des deux complexes limite l'effet global sur la voie mTOR. Les recherches se tournent donc actuellement vers des inhibiteurs pan-mTOR, capables de cibler les deux complexes simultanément (revu dans (Benjamin et al., 2011). Il en existe plusieurs, notamment le PP242 (Apsel et al., 2008), la Torin1 (Thoreen et al., 2009), l'AZD8055 (Chresta et al., 2010), ou encore l'INK128 (Hsieh et al., 2012). Tous ces inhibiteurs sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP dans le site actif de mTOR (Malina et al., 2012). On les appelle également les *asTORi* pour *active-site mTOR inhibitors*. A l'inverse de la rapamycine qui inhibe préférentiellement la S6K, les inhibiteurs pan-mTOR inhibent préférentiellement 4E-BP (Feldman et al., 2009; Hsieh et al., 2012; Thoreen et al., 2009). Ces inhibiteurs sont très utilisés dans les modèles de cellules cancéreuses, où ils induisent l'apoptose, ainsi qu'une réduction de la prolifération et de l'invasion des cellules tumorales.

2.2.2.3. Voie MAPK

La voie de signalisation MAPK englobe plusieurs cascades de kinases très conservées chez les eucaryotes. Parmi ces différentes cascades, la voie Ras-Raf-Mek-Erk, voie centrale du métabolisme cellulaire à l'image de la voie mTOR, est fortement impliquée dans la prolifération cellulaire. Elle régule l'activité de certains facteurs de traduction (notamment eIF4E), et aboutit à l'activation de nombreux facteurs de transcription régulant souvent des oncogènes, tels que la Cycline D1, responsable de la transition G1/S du cycle cellulaire.

La voie MAPK est activée par la présence de signaux dans le milieu extracellulaire (facteurs de croissance, hormones, ou encore nutriments) qui sont, à l'instar de la voie mTOR, captés par des récepteurs RTK. Par la suite, la voie se décompose en quatre niveaux successifs de kinases (**Figure. 17**).

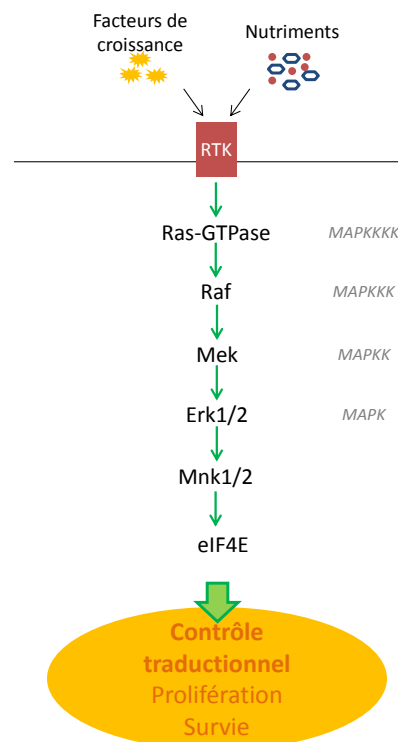


Figure 17 : Voie de signalisation MAPK en amont du contrôle traductionnel.

Le premier niveau MAPK KKKK correspond à la protéine GTPase Ras, qui se fixe sur le second niveau MAPK KKK : les protéines Raf. Les Raf activent à leur tour le troisième niveau MAPK K, les protéines Mek (1/2), responsables de l'activation du quatrième niveau MAPK, Erk (1/2) (*Extracellular signal-Regulated Kinases*). Les cibles d'Erk dans le contrôle traductionnel sont, entre autres, les Mnk (1/2) (*MAPK interacting kinases*) et la S6K.

Les dérégulations de la voie MAPK par hyperactivation sont fréquentes dans les cellules tumorales, et conduisent à une prolifération cellulaire anarchique. Souvent, ce sont des mutations au premier niveau (Ras) qui sont responsables de cette forte activité. Lorsque la kinase Ras est mutée, l'hydrolyse du GTP en GDP devient impossible et cette protéine reste continuellement active.

La voie MAPK est doublement impliquée dans la prolifération cellulaire : de façon directe en activant des facteurs de transcription, et indirectement en facilitant l'initiation de la traduction à travers la phosphorylation d'eIF4E (Furic et al., 2010). La voie MAPK possède également un rôle suppresseur de tumeur. Dans les cellules normales, l'activité d'Erk conduit à la dégradation protéique dépendante du protéasome, et induit la sénescence cellulaire (Deschênes-Simard et al., 2013). Une inactivation d'Erk par ARN interférent empêche l'activation de la sénescence, et favorise la transformation cellulaire. Dans les cellules cancéreuses, un niveau élevé de phospho-ERK est corrélé à un pronostic favorable.

Même si l'effet oncogénique de la voie MAPK est le plus commun, elle peut aussi fonctionner comme suppresseur de tumeur. Le rôle prédominant de la voie dépend de l'intensité du signal d'activation, des possibles mutations ou encore des tissus dans lesquels la MAPK est hyperactive. Ces raisons font de la voie MAPK la cible de nombreuses recherches thérapeutiques (revu dans (Burotto et al., 2014)).

2.2.2.4. *Rétrocontrôles et liens mTOR / MAPK*

Les modes d'activation et les rôles des voies mTOR et MAPK sont sensiblement identiques. En effet, dans les deux cas, la présence de facteurs de croissance, d'hormones, d'acides aminés permet l'activation des récepteurs RTK membranaires ou de RCPG (*Récepteurs Couplés à une Protéine G*). D'autre part, il est clairement établi que les voies de signalisation mTOR et MAPK sont cruciales pour la régulation du métabolisme cellulaire en général, et pour la régulation de la traduction en particulier. Les deux voies de signalisation sont chacune soumises à des boucles de rétrocontrôle issues des kinases terminales (**Figure. 18**). Dans la voie mTOR, la S6K est responsable de deux rétrocontrôles négatifs, l'un agissant sur l'activation de la PI3K, et l'autre sur l'activation du complexe mTORC2. De plus, mTORC1 inhibe également la PI3K, tandis que mTORC2 active Akt. Dans la voie MAPK, c'est Erk qui inhibe l'activation de Ras, de Raf et de Mek. Ces différents rétrocontrôles permettent une autorégulation pour un meilleur maintien de l'homéostasie cellulaire.

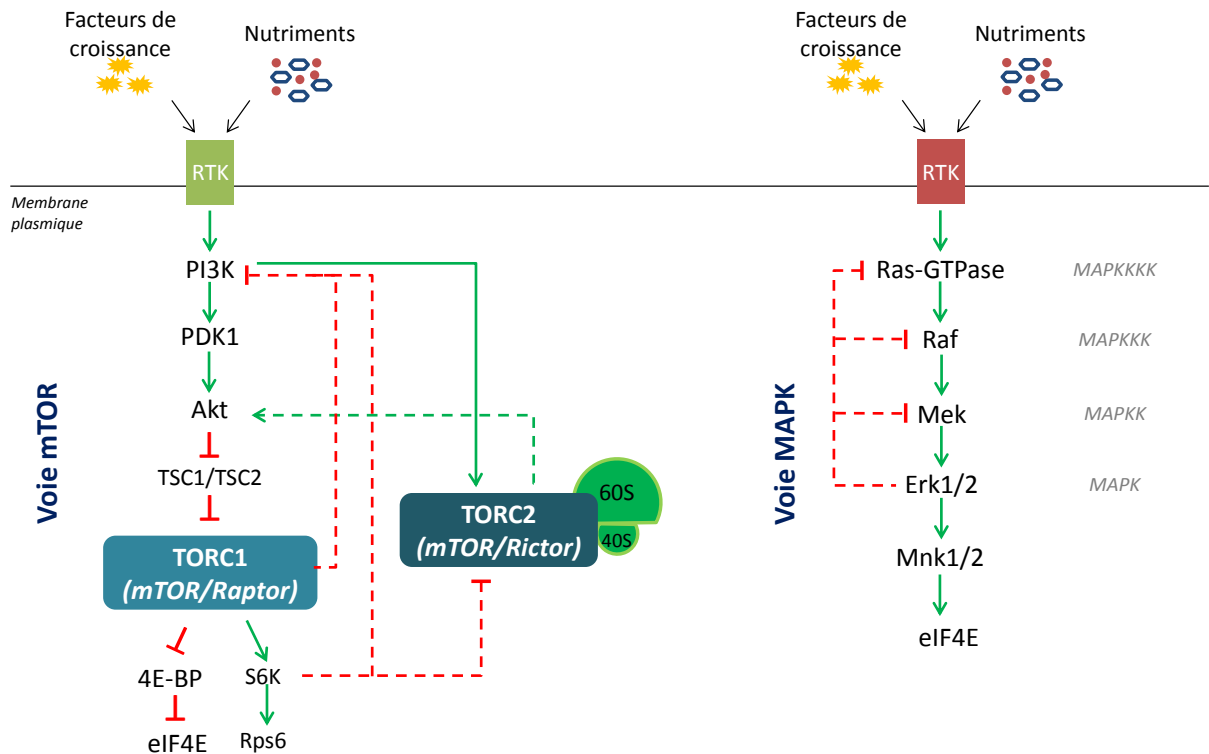


Figure 18 : Rétrocontrôles des voies de signalisation mTOR et MAPK. Les deux voies sont des cascades de kinases, activées par les mêmes substrats, et impliquées dans les mêmes processus cellulaires. Les signaux activateurs sont indiqués en vert, les signaux répresseurs en rouge, les rétrocontrôles sont indiqués en pointillés avec le même code-couleur.

De par leurs similitudes (mode d'activation et rôle dans le métabolisme cellulaire), il n'est pas surprenant que ces deux voies de signalisation puissent interagir entre elles. Les différents niveaux de la cascade de kinases de chaque voie régulent positivement ou négativement chaque niveau de l'autre voie (**Figure. 19** ; revu dans (Mendoza et al., 2011)).

- *Influences de la voie mTOR sur la voie MAPK*

La protéine Ras est activée par la PI3K mais indirectement inhibée par la S6K, puisque cette dernière inhibe IRS1, activateur de Ras. La protéine Raf est quant à elle, doublement inhibée par la voie mTOR, sous les actions négatives de PDK1 et d'Akt. En revanche, PDK1 active Mek.

- *Influences de la voie MAPK sur la voie mTOR*

Il existe une activation réciproque des deux voies par leurs kinases initiales. Ainsi, la PI3K est activée par Ras. Les kinases terminales de la voie MAPK (les Erk puis les RSK) inhibent le complexe TSC1/TSC2 (déjà inhibé par Akt), et activent le complexe mTORC1.

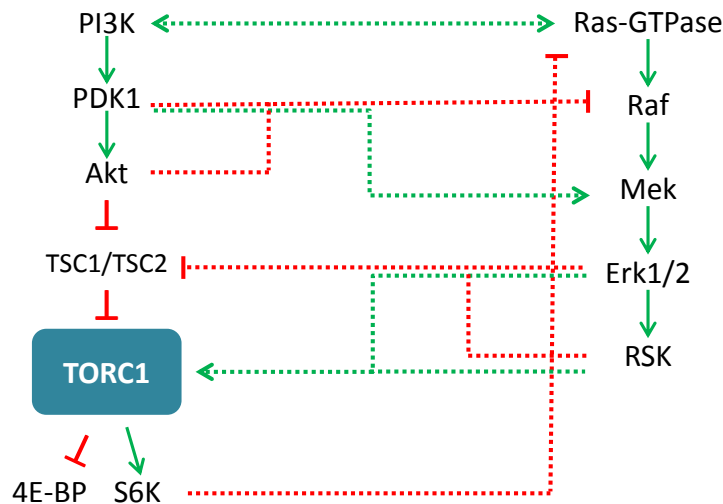


Figure 19 : Communication entre les voies de signalisation mTOR et MAPK. Les deux voies se régulent mutuellement par activations (vert) ou inhibitions (rouge).

Les voies mTOR et MAPK présentées ci-dessus sont très semblables par leurs modes d'activation, de régulation, et par leur rôle sur la traduction. Elles sont en effet en grande partie à l'origine de la régulation fine de l'activité de différents facteurs de l'initiation de la traduction, activité elle-même à l'origine du contrôle de la prolifération. Le fait qu'en plus des auto-rétrocontrôles, les deux voies communiquent par l'intermédiaire de rétrocontrôles de l'une sur l'autre, accroît le niveau de complexité nécessaire au maintien de l'homéostasie cellulaire.

2.2.3. Motifs régulateurs de l'ARNm

L'ARNm mature peut contenir différents types de motifs *cis*-régulateurs (**Figure. 20**). Les ARNm eucaryotes portent une coiffe m⁷-GTP et souvent une queue poly(A). En revanche, ils ne possèdent pas tous de motifs particuliers supplémentaires. La régulation traductionnelle par des séquences *cis*-régulatrices renvoie à la notion de spécificité de

traduction. Ces séquences sont majoritairement présentes dans les régions 5' ou 3'UTR non-codantes de l'ARNm, et sont plus rarement localisées dans la séquence codante. En plus de la coiffe, la région 5'UTR d'un ARNm peut contenir des régions structurées telles que les IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), qui recrutent la machinerie de traduction indépendamment de la coiffe ; des uORFs (*upstream Open Reading Frames*), plus favorablement traduits que l'ORF principal en dehors de certaines conditions particulières (stress, carence, *etc.*). En 3'UTR, l'ARN peut contenir des régions structurées, des motifs de polyadénylation, et enfin, la queue poly(A).

Les séquences spécifiques permettant la liaison de RBP (*RNA-Binding Proteins*) ou de micros ARN (miR) peuvent être présentes dans l'ensemble du messager, avec une préférence pour les régions UTR. Malgré tout, la grande majorité des miR agit en se fixant dans la région 3'UTR (**Figure. 20**).

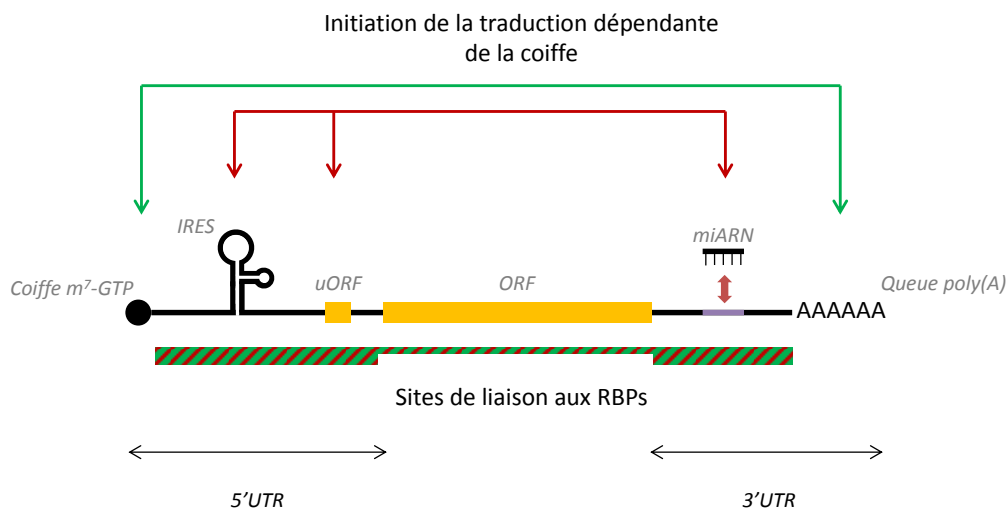


Figure 20 : Régulations d'un ARNm mature. Les motifs régulateurs favorables à l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe sont ciblés par des flèches vertes, tandis que ceux empêchant l'initiation sont ciblés par des flèches rouges. Les sites de liaison de RBP sont majoritairement présents dans les régions non codantes de l'ARNm et peuvent être activateur comme inhibiteur de la traduction. Ces sites potentiels sont donc représentés sous la forme d'un rectangle dont l'épaisseur varie en fonction de la probabilité de présence d'un site, et ce rectangle est coloré de vert et de rouge en raison du rôle positif ou négatif que peut avoir une RBP.

2.2.3.1. Queue poly(A)

La queue poly(A) joue un rôle fondamental dans l'efficacité de traduction et la stabilité des ARNm. Suite à l'étape de polyadénylation nucléaire, le pré-messager porte 250 à 300 résidus par défaut. La maturation de l'ARN pré-messager conduit à un raccourcissement

de la queue poly(A). La longueur moyenne de la queue poly(A) dans le cytoplasme varie en fonction des espèces. Chez la levure, la queue poly(A) comprend une trentaine de résidus. Ce nombre atteint 60 chez la drosophile et entre 70 et 80 dans les cellules de mammifères (Subtelny et al., 2014).

Lors du développement embryonnaire, la taille de la poly(A) subit d'énormes variations (Subtelny et al., 2014). Chez le poisson zèbre par exemple, 2h après la fécondation les messagers portent en moyenne une trentaine de résidus, tandis que 6h après la fécondation, la taille de la poly(A) est doublée. Dans l'embryon précoce, les ARNm portant une longue queue poly(A) sont plus efficacement traduits. Lorsque l'on double la taille de la poly(A), l'efficacité de traduction est multipliée par six chez le poisson zèbre ou le Xénope. Ce lien entre taille de la poly(A) et efficacité de traduction diminue dès la gastrulation et disparaît dans les cellules adultes (Subtelny et al., 2014). Dans l'embryon précoce, la transcription est inactive, tant que la transition génome maternel-génome zygotique (ou MZT pour *Maternal-to-Zygotic Transition*) n'a pas eu lieu. Il est donc nécessaire que les ARNm maternels ne soient pas dégradés, car ils ne peuvent pas être remplacés à cette étape du développement. La variation de la taille de la queue poly(A) est un mécanisme qu'exploitent les cellules embryonnaires pour réguler l'expression de gènes spécifiques à un moment précis du développement.

Polyadénylation cytoplasmique lors du développement embryonnaire

La traduction des ARNm stockés dans l'ovocyte ou l'embryon est contrôlée par la polyadénylation cytoplasmique. Deux séquences *cis*-régulatrices en 3'UTR des ARNm ciblés sont nécessaires : le site de polyadénylation (AAUAAA) et en amont, une (ou plusieurs) séquence(s) CPE (*Cytoplasmic Polyadenylation Element(s)*) ; la distance entre les deux sites est corrélée au taux de recrutement du transcrit. Les CPE, présents dans 15 à 20% des ARNm (Piqué et al., 2008) sont des séquences riches en U avec au moins quatre résidus. La protéine de liaison au site de polyadénylation est la protéine CPSF (*Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*), tandis que les CPE lient CPEB (*CPE Binding protein*). La liaison des deux protéines est stabilisée par la protéine d'échafaudage Symplekin (**Figure. 21**). D'autre part, deux enzymes aux fonctions antagonistes sont recrutées par le complexe : la déadénylase PARN (*Poly(A) RNase*) et la poly(A) polymérase GLD-2 (*Germline Development 2*). CPEB présente une dualité dans sa fonction, selon l'état de phosphorylation du résidu Ser174. En l'absence de phosphorylation de CPEB, l'activité déadénylase de PARN l'emporte sur

l'activité de GLD-2, ce qui maintient une queue poly(A) courte, et de ce fait inhibe la traduction. Lors de la maturation méiotique, la Ser/Thr kinase Aurora A phosphoryle CPEB, ce qui d'une part augmente le recrutement de CPSF au site de polyadénylation, mais surtout provoque le départ de PARN, ce qui permet à GLD-2 d'allonger la queue poly(A) pour une augmentation contrôlée de la traduction (**Figure. 21** et revu dans (Weill et al., 2012)).

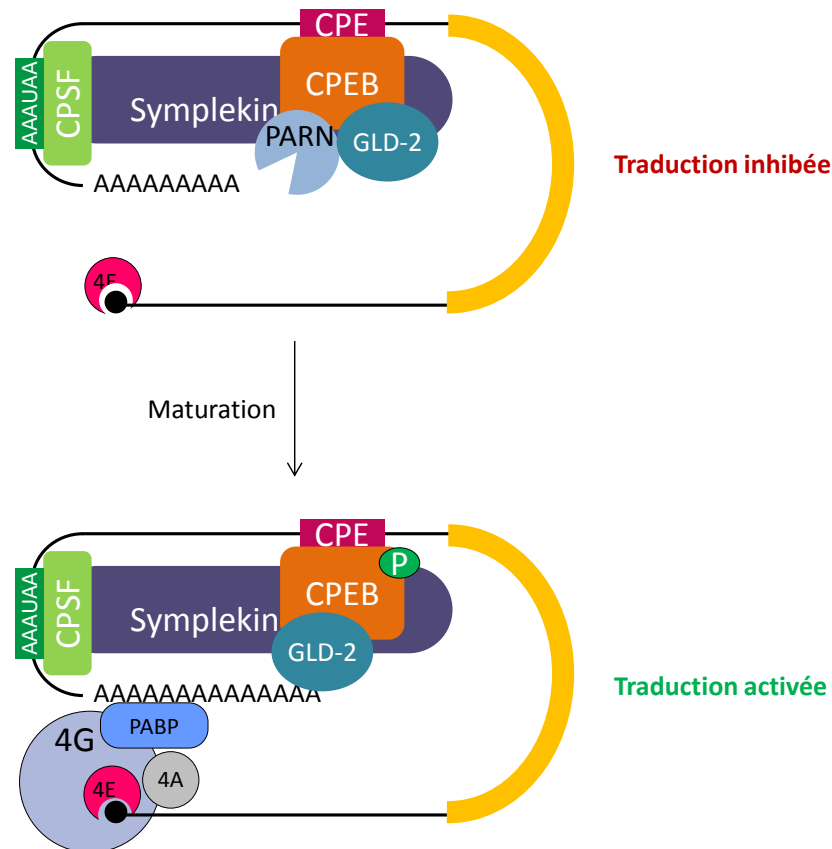


Figure 21 : Régulation traductionnelle par la polyadénylation cytoplasmique. Voir le texte pour les explications.

Les motifs CPE sont les motifs les plus représentés parmi les motifs *cis*-régulateurs des messagers recrutés dans les polysomes lors du développement embryonnaire précoce, et en particulier au cours de la maturation méiotique (Potireddy et al., 2006; Radford et al., 2008). Néanmoins, ils sont également extrêmement impliqués au cours de la neurogenèse, de la transmission synaptique et de la réponse inflammatoire (Jung et al., 2006; Weill et al., 2012).

Exemples de régulation par les CPE chez le Xénope

Au cours du développement embryonnaire précoce

La protéine Maskin identifiée chez le Xénope est une protéine capable d'interagir à la fois avec CPEB et avec la protéine de liaison à la coiffe eIF4E ciblant spécifiquement certains messagers, dont les Cyclines A et B, nécessaires au cycle cellulaire (revu dans (Richter, 2008)).

Avant la maturation méiotique, le complexe CPEB/CPSF/PARN/GLD-2/Symplekin lie Maskin par l'intermédiaire de CPEB. Grâce à son domaine de liaison à eIF4E, Maskin relie CPEB et eIF4E, et inhibe la traduction du messager en inhibant le recrutement d'eIF4G par eIF4E. Ainsi, Maskin inhibe la traduction des ARNm portant des CPE avant la maturation méiotique. En revanche, à la maturation méiotique, la kinase Aurora A phosphoryle CPEB, entraînant le relargage de PARN, laissant GLD-2 allonger la queue poly(A) qui recrute PABP. PABP porte un site de liaison pour eIF4G, différent du site d'interaction eIF4E-eIF4G. Le recrutement d'eIF4G et la phosphorylation de Maskin par Aurora A déstabilise la liaison Maskin-eIF4E, libérant eIF4E pour la liaison à eIF4G ce qui permet l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe (revu dans (Radford et al., 2008)).

D'autres RBP interviennent dans la régulation par les CPE. Les régulations issues de complexes CPEB/RBP peuvent être activatrices comme inhibitrices de la traduction (revu dans (Charlesworth et al., 2013)).

Au cours de la neurogenèse

La neuroguidin (NGDN), majoritairement présente dans le système nerveux embryonnaire, est une RBP régulatrice des ARNm portant des motifs CPE (Jung et al., 2006). En plus de sa liaison à l'ARN, NGDN s'associe à CPEB, et à eIF4E inhibant spécifiquement la traduction des messagers portant un CPE. Dans l'embryon de Xénope, lorsque la traduction de la protéine NGDN est inhibée par injection de morpholinos, une forte altération de la neurogenèse est observée, soulignant l'importance de l'extinction d'expression des cibles de NGDN pour la neurogenèse (Jung et al., 2006). La NGDN est également présente dans le système nerveux des mammifères où elle s'amoncèle en particules qui co-localisent avec

eIF4E. Cette co-localisation suggère qu'il y aurait une régulation localisée de la traduction d'ARNm spécifiques.

2.2.3.2. *micros ARN*

Bien que les CPE et CPEB puissent être responsables de la déadénylation comme de la polyadénylation en fonction des contextes physiologiques ou physiopathologiques, les séquences de liaison de micros ARN sont quant à elles, exclusivement associés à la déadénylation.

Les micros ARN sont de petits ARN non-codants composés de 21 nucléotides. Ils agissent comme régulateurs post-transcriptionnels de messagers spécifiques, en se fixant dans la région 3'UTR de leur cible. La séquence des miR est plus ou moins complémentaire de la séquence de leurs gènes cibles.

Le précurseur du miR (pri-miR) est un ARN long et structuré en « épingle à cheveux ». Il est coupé au niveau des séquences non-appariées par Drosha pour former le pré-miR. Le pré-miR est alors exporté dans le cytoplasme où il est coupé par Dicer, aboutissant à un ARN double brin, le duplexe miR-miR. Les hélicases associées dissocient les deux brins d'ARN pour former le miR mature. Le miR se fixe sur son ARNm cible, et recrute le complexe RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) formant le miRISC, miRNP (*micro RNA ribonucleoparticle*) responsable de l'extinction d'expression (**Figure. 22**).

Le complexe miRISC est composé de la protéine Argonaute (AGO) et des protéines GW182 recrutées par l'intermédiaire d'AGO. Les GW182 recrutent à leur tour les complexes de déadénylation CCR4-NOT1 et PAN2-PAN3. L'hélicase eIF4A du complexe d'initiation de la traduction est la cible du complexe miRISC (Meijer et al., 2013). Deux modèles d'inhibition d'eIF4A par le miRISC prévalent ; dans le premier cas, il est proposé qu'eIF4A serait séquestré par le miRISC, empêchant le complexe 48S d'avancer le long de l'ARNm (Meijer et al., 2013) ; dans le second cas, eIF4A serait dissocié du complexe d'initiation (Fukao et al., 2014). Il est également à noter que le complexe CCR4-NOT1 peut s'associer à DDX6, une hélicase de l'ARN, inhibitrice de l'initiation de la traduction (Coller and Parker, 2005; Rouya et al., 2014). L'action des miR se traduit ainsi par une répression traductionnelle, préalable à la déadénylation (Fukao et al., 2014). Suite à la déadénylation médiée consécutivement par CCR4-NOT1 et PAN2-PAN3, la coiffe de l'ARNm, protectrice de l'extrémité 5'UTR, est éliminée par l'enzyme de décoiffage DCP2 (*Decapping enzyme 2*)

complexée avec divers cofacteurs. L'élimination de la coiffe laisse alors la place libre aux exonucléases cytoplasmiques, notamment à XRN1, pour dégrader l'ARNm (**Figure. 22** et revu dans (Izaurralde, 2015)).

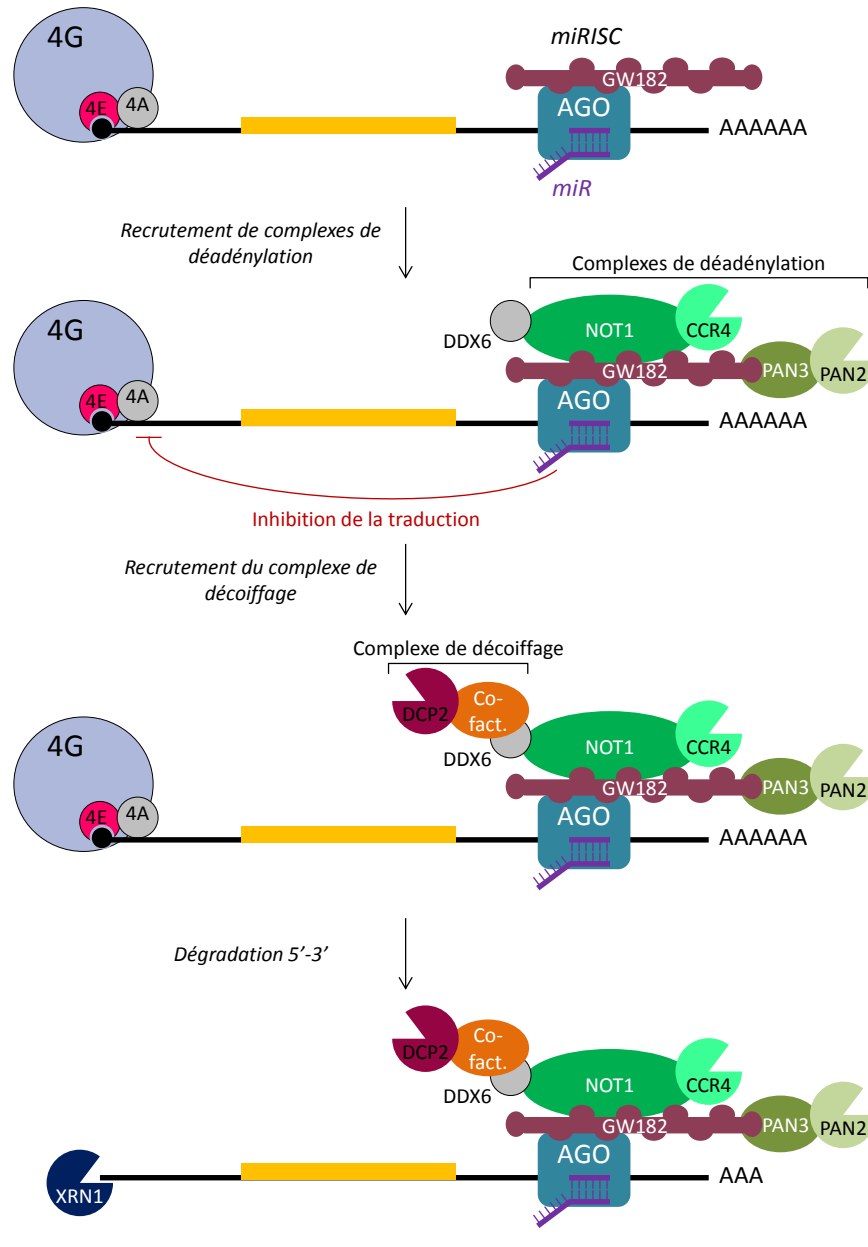


Figure 22 : Inhibition de la traduction par les miR. Voir le texte pour les explications. Modifié d'après Izaurralde, 2015.

2.2.3.3. *ARN messagers TOP*

Les TOP (*Terminal OligoPyrimidine tract*) ARNm ont la particularité de présenter une séquence de 6 à 12 pyrimidines (C ou U) à leur extrémité 5'UTR, juste en aval de la coiffe de l'ARNm, avec une cytosine en +1 de la région 5'UTR. Ces séquences TOP sont présentes dans la plupart des messagers codant pour des protéines ribosomales et des facteurs d'élongation, ainsi que dans les messagers des sous-unités e, f et h du facteur d'initiation eIF3 (Iadevaia et al., 2008).

La traduction des ARNm TOP est sous le contrôle de la voie mTOR (Fonseca et al., 2014; Thoreen et al., 2012) : active, elle favorise la traduction de messagers présentant ce motif. En revanche, si les conditions ne sont pas favorables à la croissance cellulaire (peu de nutriments ou d'énergie), la voie mTOR est inactive, et ces messagers ne sont pas traduits. La régulation de mTOR sur la traduction des ARNm TOP n'est pas encore clairement comprise. La régulation pourrait être liée à l'assemblage du complexe eIF4F (Thoreen et al., 2012) : eIF4E aurait une faible affinité pour la coiffe des TOP ARNm, ainsi, l'inhibition d'eIF4E médiée par 4E-BP serait plus efficace lorsqu'eIF4E est faiblement associé à la coiffe. Bien qu'intéressante, cette hypothèse n'est pas suffisante pour expliquer la régulation des TOP ARNm. En effet, leur traduction reste inhibée après avoir bloqué l'expression de 4E-BP dans des conditions défavorables à la croissance cellulaire (Miloslavski et al., 2014). Une autre hypothèse concernant le mode de régulation des ARNm TOP a été que les ribosomes étaient plus affins pour ces messagers lorsque la Rps6 est phosphorylée par la S6K ; or par la suite, diverses expériences menées *in vitro* et *in vivo* démontrent que la régulation des ARNm TOP ne passe pas par la S6K (revu dans (Ruvinsky and Meyuhas, 2006)).

2.2.3.4. *IRES*

L'initiation dépendante de la coiffe est le mode d'initiation dominant dans les cellules eucaryotes. Néanmoins, certains ARNm peuvent être traduits de façon indépendante de la coiffe. Cet autre type d'initiation utilise les IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), régions de l'ARNm permettant le recrutement direct de la petite sous-unité ribosomale. Celle-ci est recrutée sur l'IRES à l'AUG (ou à proximité) par l'intermédiaire de facteur(s) *trans* appelé(s) ITAF(s) (*IRES Trans Acting Factor(s)*) et de facteurs d'initiation. La traduction par les IRES a lieu dans des conditions physiologiques ou physiopathologiques particulières (cycle cellulaire, apoptose, stress, ou infection virale) dans lesquelles eIF4E est séquestré et/ou dans

lesquelles eIF4G est clivé, voire dégradé. Historiquement, les IRES ont été découverts dans les ARN viraux (Pelletier and Sonenberg, 1988), qui ont la particularité de ne pas être coiffés. Le virus utilise la machinerie traductionnelle de l'hôte, la détourne, et bloque la synthèse protéique cellulaire. Lors d'une infection virale, eIF4G est souvent clivé et perd son site d'interaction avec eIF4E. Il n'est alors plus capable d'assurer une traduction dépendante de la coiffe, mais grâce au maintien de ces interactions avec eIF4A et eIF3, il peut tout de même assurer la traduction dépendante des IRES.

Les ARN viraux ne sont pas les seuls à posséder des IRES, il existe également des IRES cellulaires (revu dans (Stoneley and Willis, 2004)). Souvent, ces ARNm codent pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle (CDK1, Cycline D1) et la croissance cellulaire (IGF), mais peuvent également coder pour des protéines impliquées dans l'apoptose et la réponse au stress (Bcl-2, DAP5). La mécanistique varie en fonction des ARNm portant les IRES, mais de manière générale, l'IRES recrute directement tout ou partie du complexe 43S *via* le ribosome et/ou le(s) ITAF(s). (**Figure. 23**). La queue poly(A) peut jouer un rôle important dans la traduction *via* les IRES, il a notamment été montré *in vivo* comme *in vitro* qu'elle était nécessaire à la traduction de deux oncogènes (c-myc et BiP), indépendamment de l'interaction eIF4G-PABP (Thoma et al., 2004).

La traduction *via* les IRES est un mécanisme qui explique que l'efficacité de traduction d'un ARNm soit maintenue lors d'une inhibition générale de la synthèse protéique.

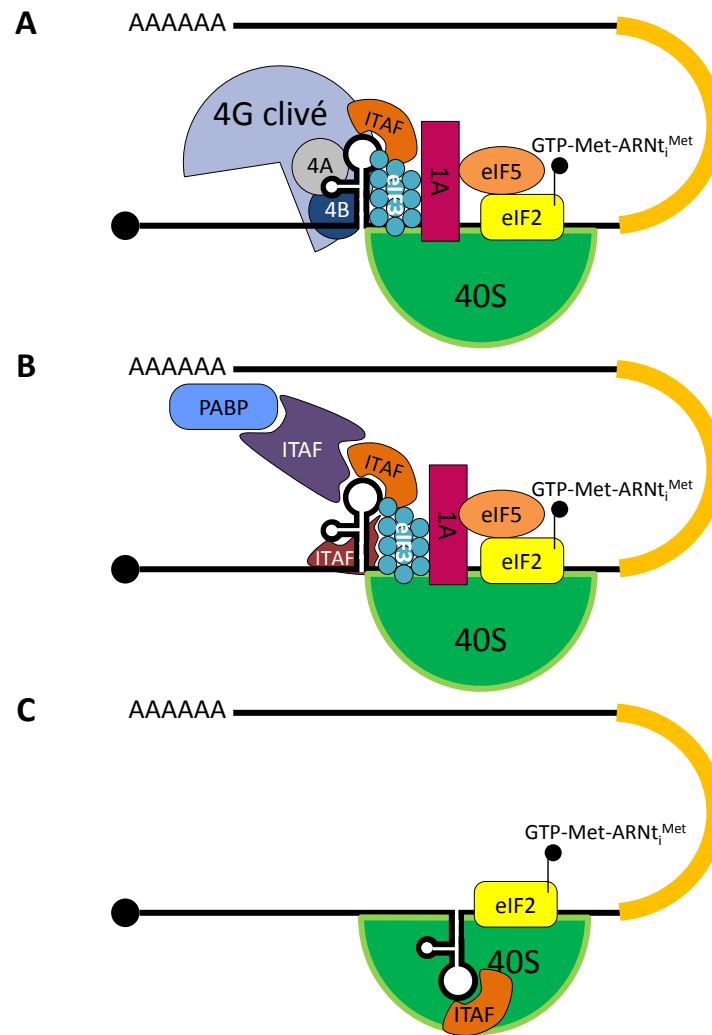


Figure 23 : Traduction dépendante des IRES dans la cellule eucaryote. La traduction médiée par les IRES ne nécessite pas forcément tous les facteurs d'initiation, mais nécessite souvent la fixation d'ITAF(s). (A) Seul eIF4E ne participe pas à l'initiation. (B) L'initiation a lieu sans l'intervention du complexe eIF4F. (C) La petite sous-unité ribosomale est directement recrutée par l'IRES et les ITAFs, et seul eIF2 (ou un autre donneur de Met-ARNt_i^{Met}) est nécessaire. Modifié d'après (Komar and Hatzoglou, 2011)

Une alternative connue à l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe ou des IRES cellulaires serait l'initiation par les CITE (*Cap-Independent Translation Enhancers*). Ces motifs, à l'origine identifiés dans des virus de plantes (Carrington and Freed, 1990), sont majoritairement localisés en 3'UTR de l'ARNm mais peuvent également être localisés en 5'UTR (**Figure. 24**). A l'image des IRES, ce sont des régions particulières de l'ARNm qui au lieu de recruter directement le ribosome, recrutent le complexe d'initiation de la traduction (avec ou sans eIF4E). Un CITE situé en 3'UTR, ne nécessite pas la présence de PABP pour la

circularisation de l'ARNm (revu dans (Shatsky et al., 2010)). Les CITE permettent donc d'initier la traduction indépendamment de la coiffe, mais à la différence des IRES, cette traduction nécessite une étape de balayage de la région 5' de l'ARNm par le complexe d'initiation. Pour cette raison, le CITE ne peut diriger une initiation interne. L'initiation alternative de la traduction qu'il utilise ne peut donc pas fonctionner sur des constructions bicistroniques, ce qui permet de distinguer les IRES des CITE.

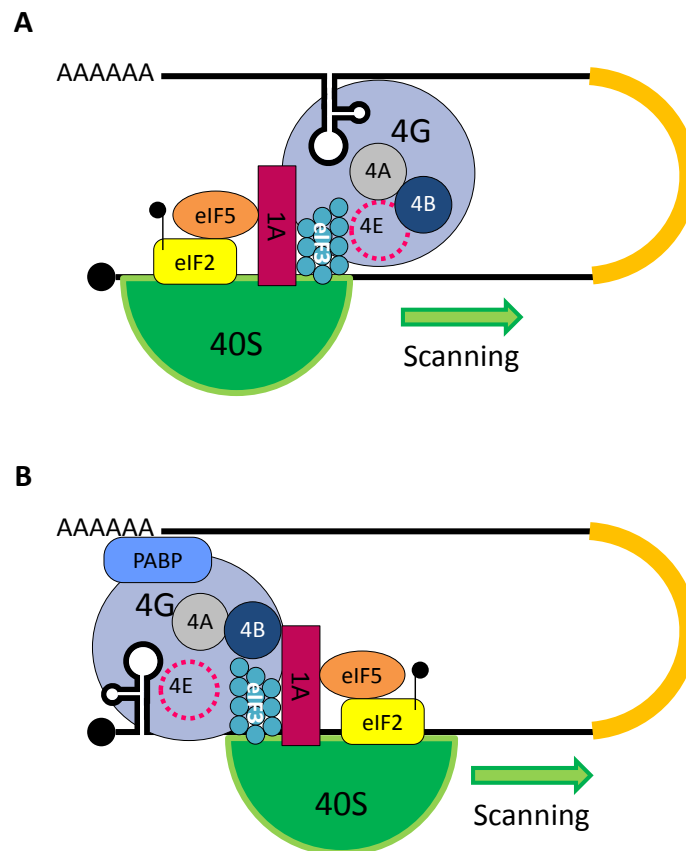


Figure 24 : Traduction par les CITE. (A) CITE localisé en 3'UTR de l'ARNm, ou (B) localisé en 5'UTR. Le facteur d'initiation eIF4E est représenté en pointillé car il n'est pas nécessaire. La différence majeure avec la traduction dépendante des IRES est que celle-ci nécessite une étape de balayage de l'ARN pour l'atteinte de l'AUG initiateur.

Le mécanisme de traduction dirigé par un CITE a été démontrée *in vitro* et dans des cellules de mammifères (Terenin et al., 2013). Les auteurs ont utilisés des ARNm dont la traduction est fortement dépendante de la coiffe (dont la β -globine par exemple), dans lesquels ils ont inséré en 5'UTR un motif de liaison à eIF4G issu d'un IRES d'ARN viral. Cette insertion a diminué drastiquement la nécessité de la coiffe pour la traduction, allant

même jusqu'à rendre la traduction uniquement dépendante de la présence d'eIF4G, et non plus du complexe eIF4F.

2.3. Étude du traductome cellulaire

La traduction est fortement régulée en fonction des différentes conditions physiologiques ou physiopathologiques que peut rencontrer la cellule eucaryote. Toutes les régulations sont autant de moyens de réponses rapides et adaptés à l'environnement et au contexte dans lequel se trouve la cellule. Les régulations traductionnelles sont à l'origine de la sélection des ARNm traduits (ou non) à un instant précis.

L'état de traduction d'un ARNm est corrélé à son association avec les polysomes (soit le nombre de ribosomes qui lui sont associés simultanément). L'ensemble de ces messagers activement traduits dans les polysomes correspond au traductome de la cellule à un temps donné ou dans une condition donnée (**Figure. 25**).

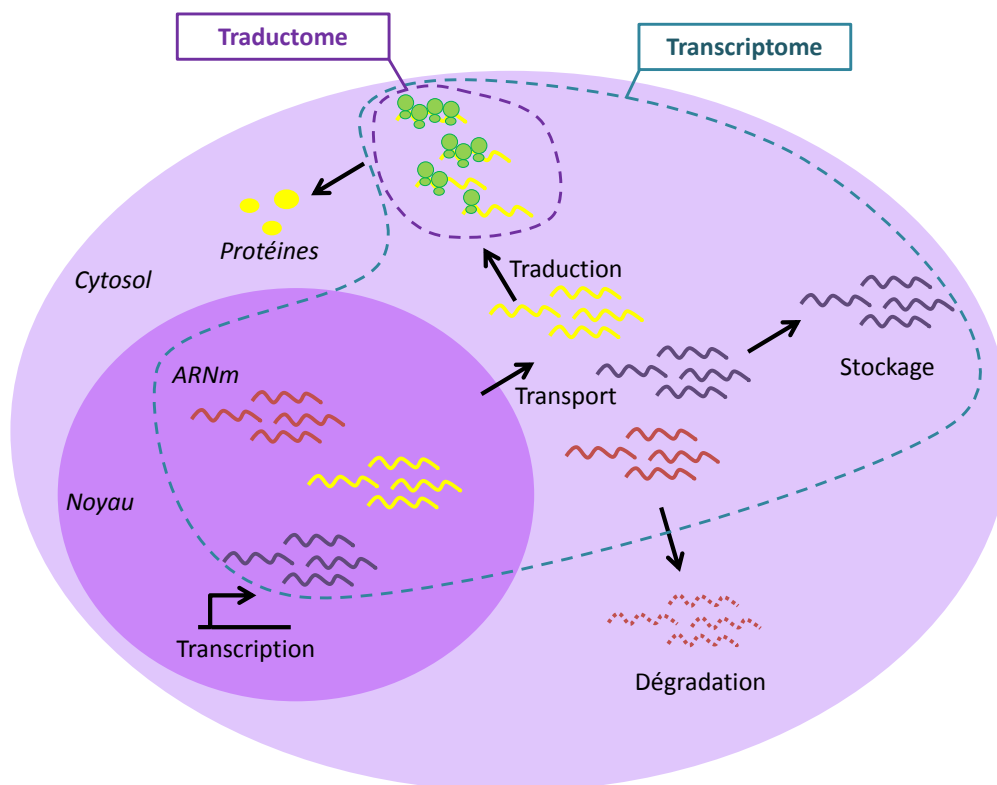


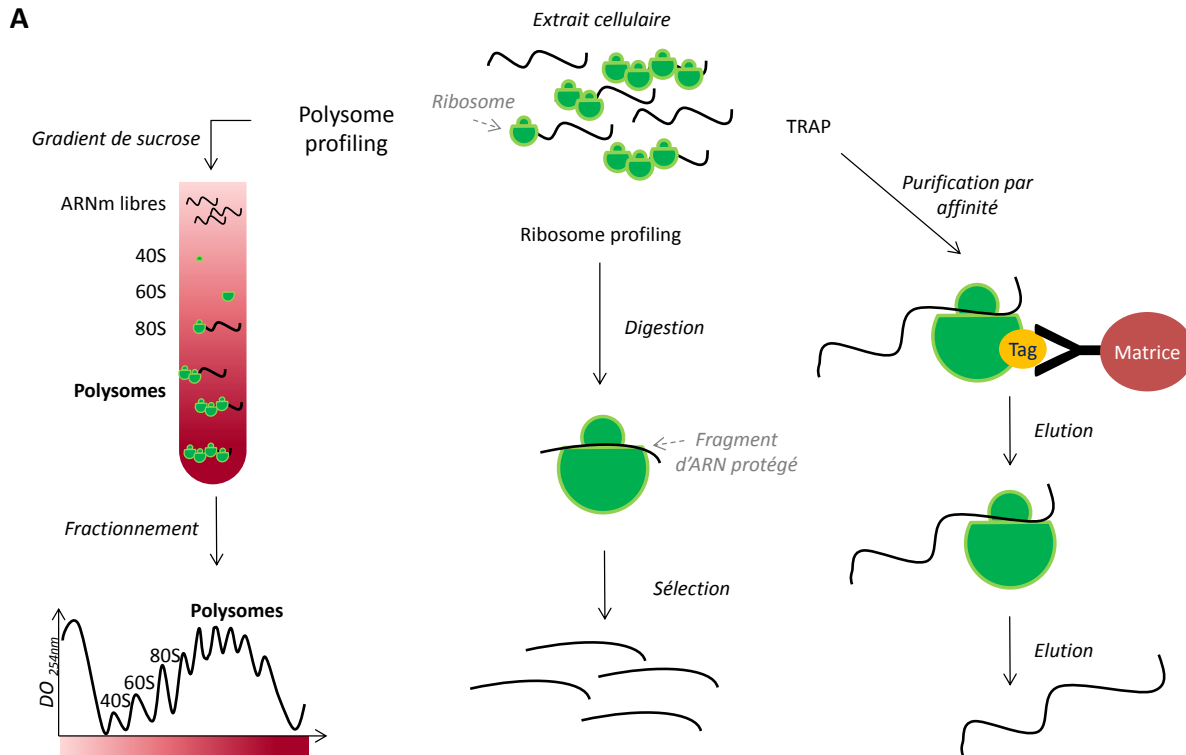
Figure 25 : Transcriptome vs traductome. L'ensemble des messagers de la cellule appartient au transcriptome cellulaire, tandis que la petite part de messagers recrutés dans les polysomes et traduits appartient au traductome cellulaire. Modifié d'après Piccirillo et al., (2014).

L'étude holistique de cette sous-partie (Kuersten et al., 2013) est un excellent moyen d'étudier les régulations traductionnelles. Par ailleurs, cette analyse permet de faire le lien entre les études transcriptomiques et protéomiques, décrites comme ayant une très faible corrélation (Vogel and Marcotte, 2012; Wang et al., 2013; Zhang et al., 2014). L'étude du traductome présente différents avantages. Contrairement à l'étude du transcriptome, elle permet de s'assurer de la réelle utilisation fonctionnelle de l'ARNm ; contrairement à l'étude du protéome, elle inclut la notion de dynamique à l'analyse. Les trois types d'analyses sont donc complémentaires.

Plusieurs techniques permettent l'étude du traductome : le polysome profiling, le ribosome profiling, et le TRAP (*Translating Ribosome Affinity Purification*) (**Figure. 26**, revu dans (King and Gerber, 2014)).

Le polysome profiling est une technique qui s'est développée à partir des années 1960 (Zomzely et al., 1966). Elle est basée sur la sédimentation différentielle des ARNm en fonction de la quantité de ribosomes qui leur sont associés. La séparation a lieu dans un gradient de sucrose, qui est ensuite fractionné. La répartition des messagers dans le gradient indique leur niveau de traduction : plus les ARNm sont associés aux fractions polysomales lourdes, plus le messenger est traduit. Cette technique peut tout aussi bien être utilisée pour des analyses holistiques que pour des analyses gènes-ciblés. Le polysome profiling permet de conserver l'intégrité des transcrits, donnant ainsi accès à leurs régions UTR, souvent impliquées dans la régulation traductionnelle. En conséquence, le polysome profiling peut être utilisé en l'absence de données génomiques robustes, ce qui permet l'étude de régulations traductionnelles chez des organismes non-modèles.

Le ribosome profiling ou ribosome foot-printing a été développé en 2009 (Ingolia et al., 2009). Cette technique est essentiellement dédiée à l'analyse haut-débit du traductome. Elle permet de purifier spécifiquement les fragments d'ARNm sur lesquels sont fixés les ribosomes à un instant donné. Le ribosome profiling a pour avantages d'indiquer précisément la position des codons initiateurs (principaux ou non), de permettre l'identification d'isoformes protéiques, et d'un point de vue plus mécanistique, de révéler la dynamique traductionnelle (vitesse de lecture ou sites de pause).



B

Méthode	Avantages	Inconvénients	Applications
Polysome profiling	<ul style="list-style-type: none"> Séquence entière de l'ARNm Quantitatif Génome facultatif 	<ul style="list-style-type: none"> Nécessité d'un grand nombre de cellules Fastidieux (temps et équipements) Pas de spécificité cellulaire Contamination potentielle par mRNPs 	<ul style="list-style-type: none"> Culture cellulaire / Tissus Etat de traduction d'une cible et variation de recrutement
Ribosome profiling	<ul style="list-style-type: none"> Séquence précise de l'ORF Position des ribosomes Identification d'ORF alternatifs Dynamique traductionnelle 	<ul style="list-style-type: none"> Nécessité d'un grand nombre de cellules Fastidieux et onéreux (temps et équipements) Pas de spécificité cellulaire Contamination potentielle par des fragments d'ARN non protégés Analyses bio-informatiques sur des fragments d'environ 30nt 	<ul style="list-style-type: none"> Culture cellulaire / Tissus Mécanisme de la progression ribosomale
TRAP	<ul style="list-style-type: none"> Peu de cellules Spécificité cellulaire / Tissulaire Simple 	<ul style="list-style-type: none"> Faible résolution Manipulation génétique 	<ul style="list-style-type: none"> Organismes génétiquement modifiés

Figure 26 : Techniques d'étude du traductome. (A) Représentation schématique de chaque technique. Le polysome profiling (à gauche) permet, par ultracentrifugation, la séparation des composants d'un lysat cellulaire dans un gradient linéaire de sucrose. Le gradient est ensuite fractionné, tout en étant couplé à un spectrophotomètre qui donne le profil d'absorbance du gradient. Cette technique permet la séparation successive des ARN libres, des sous-unités ribosomales, des monosomes et des polysomes. La répartition d'un messenger dans le gradient indique son niveau de traduction. Le ribosome profiling (au centre) permet de déterminer la séquence de l'ARNm fixée par le ribosome en digérant à la RNaseI les fragments non-protégés. Les fragments sont ensuite enrichis sur coussin de sucrose, fractionnés en fonction de leur taille par électrophorèse, et ne sont sélectionnés que les fragments de 30nt. Le TRAP (à droite) utilise des ribosomes étiquetés, ce qui permet leur isolement par anticorps. Les ARNm sont ensuite libérés du ribosome et analysés. Ces trois techniques peuvent être utilisées pour une analyse haut-débit du traductome cellulaire. (B) Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients de chaque technique d'étude du traductome. Modifié d'après King and Gerber (2014).

Le TRAP est une technique datant des années 2000 (Inada et al., 2002) qui nécessite peu de matériel biologique et permet d'étudier la traduction dans un type cellulaire particulier. Le TRAP nécessite d'avoir des échantillons dans lesquels des protéines ribosomales sont étiquetées et dont l'expression est sous le contrôle d'un promoteur tissu-spécifique. Les complexes ARNm-ribosomes étiquetés présents dans les cellules d'intérêt sont capturés par affinité. Il est cependant important de mentionner que tous les ribosomes étiquetés sont capturés, incluant les monosomes comme les polysomes. Cette technique ne reflète donc pas parfaitement l'intensité de traduction d'un ARNm. Néanmoins, étant donné que l'essentiel des régulations traductionnelles ont lieu avant la formation du monosome, l'approximation du niveau de traduction d'un ARNm donnée par le TRAP reste très bonne.

Dans cette partie je me suis attachée à présenter les régulations traductionnelles majeures dans la cellule. En fonction du contexte cellulaire, les régulations mises en place peuvent être positives comme négatives. Rien ne reste figé, ce qui assure une réponse cellulaire rapide et adaptée. Ces régulations forment un réseau d'interactions complexes, dont l'activité peut être représentée comme une balance qui permet le maintien de l'homéostasie cellulaire.

Les régulations traductionnelles sont essentielles à chaque étape de la vie d'un organisme. Cependant, lors du développement embryonnaire précoce, elles sont particulièrement décisives, puisque seules responsables de la régulation de l'expression des gènes.

Le lien entre régulations traductionnelles et premiers cycles cellulaires fera l'objet de la troisième partie de cette introduction.

3. Importance des régulations traductionnelles pour le développement embryonnaire précoce

La relation entre régulation traductionnelle et prolifération cellulaire a été exposée au cours de la deuxième partie de cette introduction. Le développement embryonnaire précoce et les régulations traductionnelles sont intimement liés. En effet, au cours des premières divisions mitotiques rapides de l'embryogenèse précoce, les messagers maternels, préalablement stockés dans l'ovocyte régissent la synthèse protéique, indépendamment de l'activité transcriptionnelle.

Le passage de l'ovocyte à l'embryon (ou OET pour *Oocyte-to-Embryo Transition*) marque le début du développement chez les métazoaires (revu dans (Horner and Wolfner, 2008)). Cette transition est déclenchée par la fécondation de l'ovocyte et implique l'entrée du gamète mâle, la fusion des deux pronuclei et le début des premiers cycles mitotiques. Dans certaines espèces, l'œuf doit au préalable terminer sa maturation méiotique pour entrer en mitose. C'est le cas de la drosophile, dont l'ovocyte est bloqué en métaphase I, ou de la plupart des vertébrés, pour qui l'ovocyte est bloqué en métaphase II.

Qu'il y ait maturation méiotique ou non, l'ovocyte sort de sa quiescence à l'OET. La synthèse protéique nécessaire à l'entrée en cycle est uniquement basée sur l'utilisation des réserves accumulées par l'ovocyte lors de l'ovogenèse (ARNm et protéines maternels), indépendamment de la transcription. Après plusieurs divisions mitotiques successives, les ARNm maternels sont dégradés et il y a activation du génome zygotique, il s'agit d'une deuxième transition, la transition génome maternel-génome zygotique (ou MZT pour *Maternal-to-Zygotic Transition*) (**Figure. 27**).

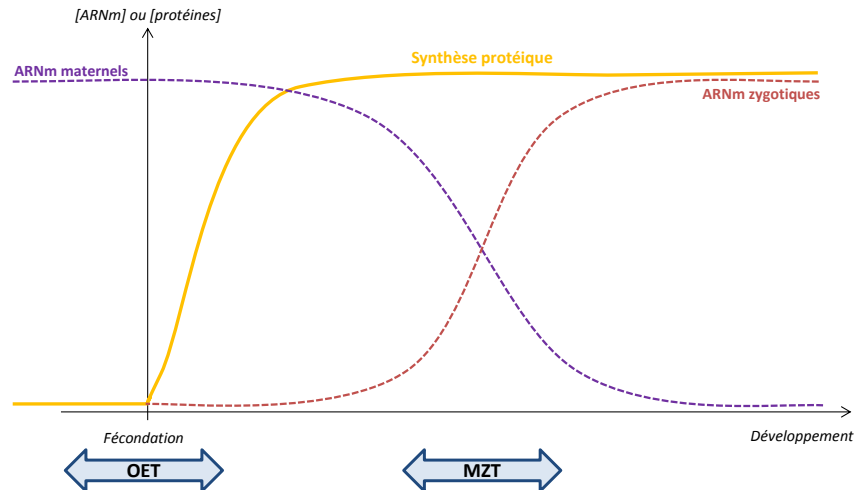


Figure 27 : Changements traductionnels au cours du développement précoce. Avant la fécondation l'ovocyte possède un stock important d'ARNm maternels, et la transcription comme la traduction sont quasiment inexistantes. La fécondation provoque une très forte hausse de la synthèse protéique, basée sur l'utilisation des ARNm maternels stockés, indépendamment de la transcription, c'est l'OET. Ensuite, les ARNm maternels sont peu à peu dégradés, mais l'activation du génome zygotique provoque une augmentation de la transcription (MZT) pour maintenir le taux élevé de synthèse protéique.

La régulation temporelle de l'expression des messagers maternels à l'OET est essentielle pour le développement précoce. L'utilisation des ARNm maternels à l'OET a fait l'objet d'études par le passé, permettant l'identification de certains ARNm traduits à la fécondation, c'est notamment le cas de la Cycline B chez l'embryon d'oursin (Kelso-Winemiller et al., 1993). Néanmoins, de par l'essor que connaissent les techniques d'étude du recrutement polysomal, il est aujourd'hui possible d'avoir une vision globale des changements qui ont lieu à cette étape décisive du développement ; l'objectif étant d'avancer dans la compréhension des mécanismes qui régissent la régulation traductionnelle des messagers maternels, responsables de l'entrée en cycle.

3.1. *Étude holistique de la transition ovocyte-embryon*

3.1.1. Chez la souris

L'analyse des messagers traductionnellement régulés à la maturation méiotique (Chen et al., 2011) a permis de déterminer que 60% de ces ARNm sont constitutivement traduits (classe I), 20% sortent des polysomes lors de la maturation (classe II) et 20% sont recrutés dans les polysomes (classe III). Les ARNm de la classe II sont majoritairement instables et il semble qu'ils soient soumis à un fort taux de dégradation, à la suite de leur dérecrutement ; à l'inverse, les messagers appartenant à la classe III sont très stables. Pour l'essentiel, les ARNm de classe III codent pour des protéines impliquées dans le cycle cellulaire, la régulation de la transcription et le remodelage de la chromatine, ces deux derniers processus jouant un rôle déterminant dans la future MZT.

Les motifs *cis*-régulateurs jouent un rôle essentiel dans le recrutement polysomal des ARNm maternels stockés lors de la transition ovocyte-embryon chez la souris (Chen et al., 2011; Potireddy et al., 2006; Potireddy et al., 2010). La régulation temporelle de l'expression des ARNm maternels est finement contrôlée par la présence de motifs, dont la reconnaissance varie au cours du développement, notamment entre la maturation méiotique et le début de la mitose (Potireddy et al., 2010). Le motif CPE est le motif communément admis comme responsable du recrutement polysomal au cours du développement précoce, et en particulier au cours de la maturation méiotique où il est le motif *cis*-régulateur majoritaire parmi les ARNm recrutés (Chen et al., 2011; Potireddy et al., 2006). Contrairement au Xénope, le recrutement ne corrèle pas avec la distance du CPE au site de polyadénylation, mais avec le nombre de CPE portés par l'ARNm. Lors de la transition méiose-mitose, des motifs autres que le CPE entrent en jeu. Un ensemble complexe de nouveaux motifs activateurs ou répresseurs (respectivement TAE ou TRE pour *Translation Activating/Repressing Elements*), contrôlent la traduction, et agissent en cascade (Potireddy et al., 2010).

Un enrichissement de motifs permettant la liaison d'autres RBP régulatrices de la traduction telles que Dazl (*Deleted in azoospermia-like protein*), Pumilio et Musashi est également observé. Dazl interagit avec Pumilio comme avec Musashi, ce qui complexifie encore la régulation traductionnelle médiée par ces RBP. Le recrutement polysomal est d'autant plus important lorsque les ARNm portent à la fois des CPE et le motif de liaison à

Dazl. Ces motifs sont déterminants, 70% des messagers chez qui ils sont absents sont au moins dérecrutés, si ce n'est dégradés (Chen et al., 2011).

L'ARNm de Dazl est lui-même régulé par la polyadénylation dépendante de CPE-CPEB, lors de la transition VG-MI (*Vésicule Germinale-Métaphase I*), induisant une augmentation de sa traduction. L'accumulation de la protéine Dazl néosynthétisée assure la traduction sélective des messagers de classe III au cours de la MII (*Métaphase II*), y compris la sienne, puisque l'ARNm codant pour Dazl comporte le motif de liaison à la protéine Dazl. La traduction sélective médiée par Dazl est régulée dans le temps (première régulation d'expression par CPEB1, puis par lui-même) mais aussi dans l'espace. L'accumulation de Dazl est localisée aux deux pôles du fuseau mitotique, et nécessaire à la maturation méiotique (Chen et al., 2011). Cela pourrait être le moyen d'avoir une traduction localisée des ARNm de classe III, majoritairement impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et de ses composants. De manière intéressante, d'autres composants de la machinerie traductionnelle sont associés au fuseau mitotique au cours de la maturation méiotique chez la souris (Romasko et al., 2013) comme chez le Xénope (Blower et al., 2007). D'autre part, une étude au cours de la gamétogenèse chez le Xénope, a permis d'établir que Dazl lie PABP (Collier et al., 2005), ce qui favoriserait l'activation de la traduction médiée par Dazl.

Cela suggère que chez la souris, au cours du développement précoce, les motifs *cis*-régulateurs de l'ARN jouent un rôle crucial. Dans un cas (Potireddy et al., 2010) elle dépend de la dissociation de complexes inhibiteurs de la traduction, et de la libération des ARNm pour la machinerie traductionnelle ; dans l'autre (Chen et al., 2011), la spécificité temporelle d'expression dépend de l'accumulation de la protéine Dazl qui va réguler la traduction des ARNm nécessaires à la maturation méiotique.

De manière intéressante, une étude plus récente de l'équipe de M. Conti démontre le rôle important de la voie mTOR dans la traduction sélective d'un sous-groupe de messagers maternels (Chen et al., 2013). Dans les cellules somatiques, le traductome dépendant de la voie mTOR est enrichi en ARNm codants pour des protéines ribosomales ou des facteurs de traduction, portant des motifs 5'TOP (Fonseca et al., 2014). Cependant aucun des ARNm traduits lors de la maturation méiotique ne codent pour cette catégorie de protéine, bien qu'il y ait une activation de la voie mTOR. A l'inverse ces ARNm font même partie des ARNms préférentiellement dérecrutés et dégradés (Chen et al., 2011). Cela suggère que dans ce contexte développemental précis, la voie mTOR régulerait la traduction d'autres cibles.

3.1.2. Chez la drosophile

Un premier travail d'analyse globale de traductomes de l'embryogenèse précoce de la drosophile par ribosome profiling a permis de montrer les importants changements de recrutements d'ARNm dus au développement (Qin et al., 2007). Il apparaît que les ARNm appartenant à une même catégorie fonctionnelle sont uniformément régulés. Il existe donc lors du développement embryonnaire précoce de la drosophile une corrélation entre l'expression des gènes et leur fonction.

Les relations entre traductome et protéome chez la drosophile ont fait l'objet d'une étude qui a révélé l'existence d'une compensation dynamique entre la traduction et le renouvellement protéique lors de l'OET (Kronja et al., 2014b). Dans les ovocytes matures, les ARNm surreprésentés dans les polysomes appartiennent à la catégorie des gènes impliqués dans la maturation méiotique. En revanche, à l'activation de l'œuf, il y a un recrutement préférentiel des ARNm appartenant aux catégories « RNA-processing » et « mRNA binding », transcrits souvent nécessaires au bon déroulement de la MZT (Kronja et al., 2014b). L'observation d'un fort recrutement polysomal est fréquemment corrélée avec l'accumulation protéique ; cependant, malgré un fort recrutement polysomal, la concentration de certaines protéines ne semble pas être affectée. Les auteurs soulignent l'importance de la dégradation protéique : si le taux de néosynthèse protéique est équivalent à celui de la dégradation, l'augmentation nette de la quantité de protéine peut être masquée. L'hypothèse qui ressort de ces résultats est qu'il y aurait une réinitialisation du protéome à l'OET, comme il y a une réinitialisation du transcriptome à la MZT.

La Ser/Thr kinase PNG (*PAN GU*) est impliquée dans le recrutement polysomal de 60% des transcrits surexprimés à la fécondation (dont les Cyclines A et B), bien que son mode d'action sur le recrutement polysomal ne soit pas encore établi. La perte d'expression de PNG chez des mutants (mutants *png*), induit l'absence de recrutement de beaucoup d'ARNm maternels, avec un retour à un profil de traduction ressemblant fortement à celui des ovocytes avant la fécondation.

De manière intéressante, PNG est également impliquée dans le dérecrutement de 70% des transcrits sous-exprimés. La régulation médiée par PNG est donc modulée. Les ARNm se divisent en trois classes de dépendance à l'activité de la kinase PNG : traduction dépendante, indépendante, ou partiellement dépendante.

Pour quelques-unes de ses cibles, PNG semble être à l'origine d'une balance entre le niveau de traduction et le niveau de dégradation protéique, maintenant les niveaux protéiques stables au cours de l'OET. Les auteurs proposent que PNG agisse de façon indirecte, à travers un effecteur. Il pourrait s'agir du répresseur traductionnel Pumilio, car la mutation de *Pumilio* permet de restaurer la traduction d'ARNm inhibée chez les mutants *png*. Mais cette hypothèse n'est pas suffisante pour expliquer l'action de PNG, car il n'y a pas d'enrichissement significatif des sites de liaison de Pumilio parmi les messagers recrutés. Il y aurait donc d'autres intervenants permettant le contrôle traductionnel par PNG. Les auteurs ont notamment identifié deux régulateurs traductionnels dont les ARNm sont des cibles de PNG, l'un étant activateur (CG17514), l'autre répresseur (Cup). De manière intéressante, chez les mutants *png*, l'activateur traductionnel est réprimé tandis que le répresseur est activé. Encore une fois, les régulations négatives de la traduction semblent être au cœur de la transition ovocyte-embryon.

Malgré la nécessité d'augmenter le taux de synthèse protéique à la fécondation (Horner and Wolfner, 2008), pour tous ces auteurs, il existe une fenêtre d'activité extrêmement réduite où les régulations traductionnelles ont un immense rôle à jouer et dont beaucoup sont inhibitrices.

3.2. *Développement précoce de l'embryon d'oursin et régulations traductionnelles*

3.2.1. Intérêt du modèle oursin

L'oursin est un invertébré marin appartenant aux échinodermes. Cet animal appartient à un phylum à la base des deutérostomes, caractérisés par des génomes proches de ceux des vertébrés mais n'ayant pas subi de duplication du génome. Le séquençage du génome de l'oursin américain *Strongylocentrotus purpuratus* (Sodergren et al., 2006) a permis de déterminer qu'il présente 70% d'identité avec le génome humain. La non-redondance et la conservation des familles de gènes et des voies de signalisation permettent de faciliter les analyses moléculaires. Une femelle oursin pond simultanément jusqu'à 10^8 œufs de grande taille, ce qui permet de ne pas être limitant en quantité de matériel biologique et facilite la manipulation.

L'avantage majeur de ce modèle est que l'ovocyte d'oursin a déjà terminé sa maturation méiotique avant la fécondation, contrairement aux modèles embryonnaires classiques. A la fécondation, l'embryon entre donc directement en phase S du cycle cellulaire. Les premières divisions mitotiques ne passent que par les phases S et M, et sont donc extrêmement rapides (Parisi et al., 1978). De plus, au cours de ces premières divisions, les cellules sont naturellement synchrones, rendant les conditions expérimentales homogènes et reproductibles. Ensemble, ces caractéristiques en font un modèle idéal pour les analyses biochimiques, microscopiques et pour les analyses de biologie moléculaire.

Plus particulièrement, les oursins récoltés en Bretagne pour ce travail appartiennent aux espèces *Paracentrotus lividus* et *Sphaerechinus granularis*. Dans l'espèce *S. granularis*, il est possible d'obtenir des gamètes tout au long de l'année, tandis que dans l'espèce *P. lividus*, saisonnière, les gamètes sont produits sur une plus courte période (de fin avril à fin août en Bretagne). En raison du fait que nous avons plus de données génomiques pour l'espèce *P. lividus* (banque d'EST et séquençage du génome en cours), c'est elle qui a essentiellement été utilisée pour mener à bien ce travail.

Dans les œufs non-fécondés, le taux de synthèse protéique est très faible. A l'instar des autres modèles embryonnaires (Horner and Wolfner, 2008), la fécondation provoque une augmentation drastique de la synthèse protéique (Epel, 1967) dont va dépendre l'entrée en mitose (Wagenaar, 1983). Cette néosynthèse est indépendante de la transcription et est uniquement basée sur des ARNm maternels préalablement stockés dans l'ovocyte (Malkin et al., 1964).

3.2.2. Progression vers le premier cycle embryonnaire

La fécondation de l'œuf d'oursin par le spermatozoïde induit la mise en place d'un ensemble complexe d'évènements coordonnés, aboutissant à la mitose. L'entrée du spermatozoïde provoque une dépolarisation membranaire (revu dans (Jaffe and Cross, 1986)). La dépolarisation membranaire induit l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants menant à une forte augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire. Cette « bombe calcique » conduit à la levée de la membrane de fécondation renfermant les granules corticaux (revu dans (Whitaker, 2006)). La dépolarisation membranaire puis la levée de la membrane de fécondation empêchent la polyspermie. La fécondation provoque également une alcalinisation du milieu intracellulaire. Les augmentations de Ca^{2+} intracellulaire et de pH sont impliquées

dans la synthèse protéique et facilitent la fusion des pronuclei, puis la mise en place du fuseau mitotique, mais sont insuffisantes à l'entrée en mitose (revu dans (Horner and Wolfner, 2008)).

L'œuf non-fécondé haploïde est maintenu dans une phase semblable à la phase G1 sous l'action de la MAPK Erk1 qui est inactivée à la fécondation (**Figure. 28**). L'œuf fécondé entre alors dans une phase de réplication de l'ADN, prérequis à l'entrée en mitose. Au cours de ce premier cycle, la voie mTOR est active et nécessaire (Salaün et al., 2003). La fécondation donnant lieu à une entrée massive d'acides aminés au sein de la cellule (Epel, 1972), il est possible que l'activation de la voie mTOR en soit la conséquence.

La progression à travers les différentes phases du cycle cellulaire est orchestrée par les CDK (*Cyclin Dependent Kinase*). Les cyclines, partenaires régulateurs indispensables à l'activité catalytique des CDK ont été identifiées pour la première fois dans l'embryon d'oursin (Evans et al., 1983). Les cyclines ont la particularité d'être dégradées cycliquement, en phase avec la division cellulaire. Par exemple, le complexe CDK1/Cycline B est actif seulement en mitose (**Figure. 28** et revu dans (Le Breton et al., 2005)). La phosphorylation de CDK1, la localisation cellulaire et la dégradation de Cycline B régulent la formation du complexe CDK1/Cycline B. L'ARNm de Cycline B est maternellement présent, et l'accumulation de la protéine (**Figure. 28**) est cruciale pour l'entrée dans le cycle cellulaire ; lorsque l'accumulation est bloquée par l'inhibition de la voie mTOR, l'embryon ne rentre pas en cycle ((Salaün et al., 2004) et Chassé et al., Article 2). Il est intéressant de noter que l'inhibition de la voie MAPK bloque également le cycle cellulaire. En effet, malgré l'inactivation drastique qu'elle subit à la fécondation, la voie se réactive faiblement à la mitose (**Figure. 28**). Ce léger pic d'activité est nécessaire à la division cellulaire, car le traitement par un inhibiteur de la voie MAPK bloque la mitose.

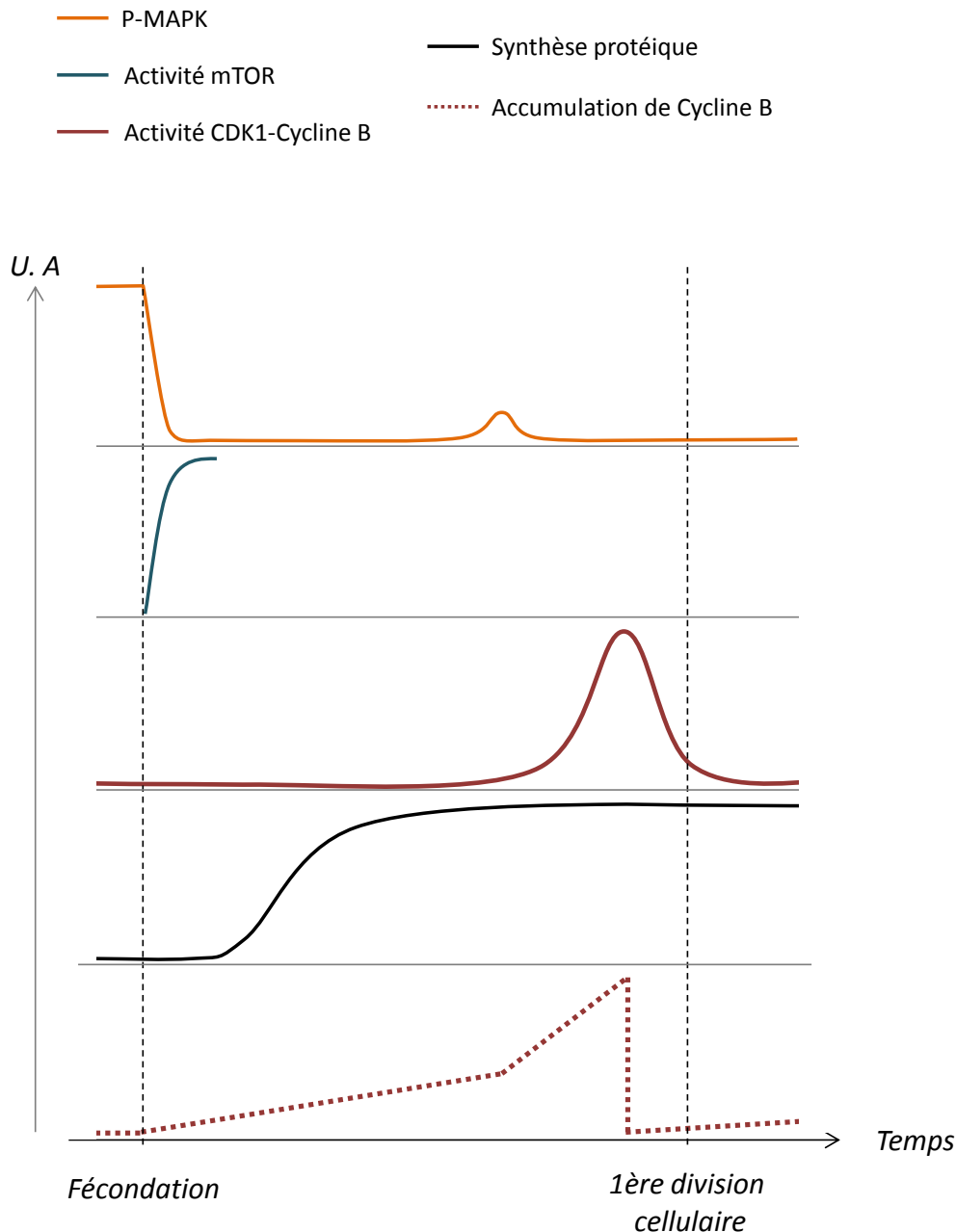


Figure 28 : Schéma récapitulatif des différents événements ayant lieu à la fécondation chez l'oursin.

L'augmentation de synthèse protéique observée après la fécondation est multifactorielle. Dans les années 80, deux théories prévalent. La première décrit les ARNm maternels avant la fécondation comme des ARNm masqués : les ARNm seraient stockés dans des particules ribonucléoprotéiques, les rendant indisponibles pour la traduction. La seconde théorie vise la disponibilité et l'activité de la machinerie traductionnelle : il y aurait des éléments limitant à la formation du complexe d'initiation. Les deux hypothèses se vérifient

(Kelso-Winemiller and Winkler, 1991; Winkler et al., 1985), puisqu'il y a une augmentation graduelle de la disponibilité des ARNm, et des composantes de la machinerie traductionnelle. La synergie entre ces deux paramètres est responsable de la régulation de la synthèse protéique à la fécondation dans l'embryon d'oursin.

3.2.3. Régulations traductionnelles chez l'embryon d'oursin

3.2.3.1. Facteurs d'initiation

Les gènes étant fortement conservés entre les échinodermes et les mammifères, il existe un orthologue de chaque facteur d'initiation de la traduction chez l'oursin (Morales et al., 2006).

Dans les œufs non-fécondés, la formation du complexe eIF4F est inhibée en raison de l'inhibition de la liaison eIF4E-eIF4G par la protéine inhibitrice 4E-BP (**Figure. 29**). A la fécondation, 4E-BP est hyperphosphorylé puis dégradé de manière dépendante de l'activité de la kinase mTOR (Cormier et al., 2001; Salaün et al., 2003). Le facteur d'initiation eIF4E est alors disponible pour la protéine plateforme eIF4G (Oulhen et al., 2007), ce qui active la traduction dépendante de la coiffe (**Figure. 29**). L'utilisation de la rapamycine comme inhibiteur de la voie mTOR inhibe la dégradation de 4E-BP. Le maintien du complexe eIF4E-4E-BP a pour conséquence l'inhibition de synthèse protéique globale et l'arrêt du cycle. L'augmentation de synthèse protéique nécessaire au cycle cellulaire est donc sous la dépendance de la voie mTOR. L'augmentation de la polyadénylation des ARNm maternels existe chez l'oursin (Wilt, 1977). Elle n'est cependant pas nécessaire puisqu'un traitement à la cordycépine (inhibiteur de la polyadénylation) n'inhibe pas l'entrée en cycle (Fromson and Duchastel, 1975) ; contrairement au Xénope, où la cordycépine bloque la progression dans la maturation méiotique (Kuge and Inoue, 1992).

La formation du complexe 43S est également inhibée avant la fécondation car la sous-unité α d'eIF2 est phosphorylée (Costache et al., 2012). La fécondation engendre une déphosphorylation de cette sous-unité (**Figure. 29**) nécessaire à l'augmentation de synthèse protéique et à l'entrée dans le cycle cellulaire. Trois des quatre kinases d'eIF2 α chez les mammifères ont été décrites dans le génome de *S. purpuratus*, à savoir GCN2, HRI et PERK. La (ou les) kinase(s) responsable(s) de la phosphorylation d'eIF2 α chez l'oursin n'est (ne sont) cependant pas clairement identifiée(s). La kinase GCN2 semble néanmoins être la

candidate préférentielle. Dans les ovocytes murins, la kinase est fortement présente et phosphoryle eIF2 α . A la fécondation eIF2 α est déphosphorylée, suggérant que GCN2 joue un rôle important dans la maturation de l'ovocyte (Alves et al., 2009). GCN2 est une kinase activée par la carence en acides aminés et inhibée par leur présence, or la fécondation de l'œuf d'oursin provoque une forte entrée d'acides aminés dans la cellule, ce qui favoriserait l'inactivation de GCN2 et la déphosphorylation d'eIF2 α . De plus, l'utilisation d'anticorps dirigés contre un fragment de GCN2 murin dans les œufs non-fécondés d'oursin permet l'identification d'une protéine dont la taille correspond à celle de GCN2. Par analogie avec le modèle murin et à la lumière des connaissances chez l'oursin, GCN2 pourrait bien être la kinase impliquée dans la régulation d'eIF2 α à la fécondation.

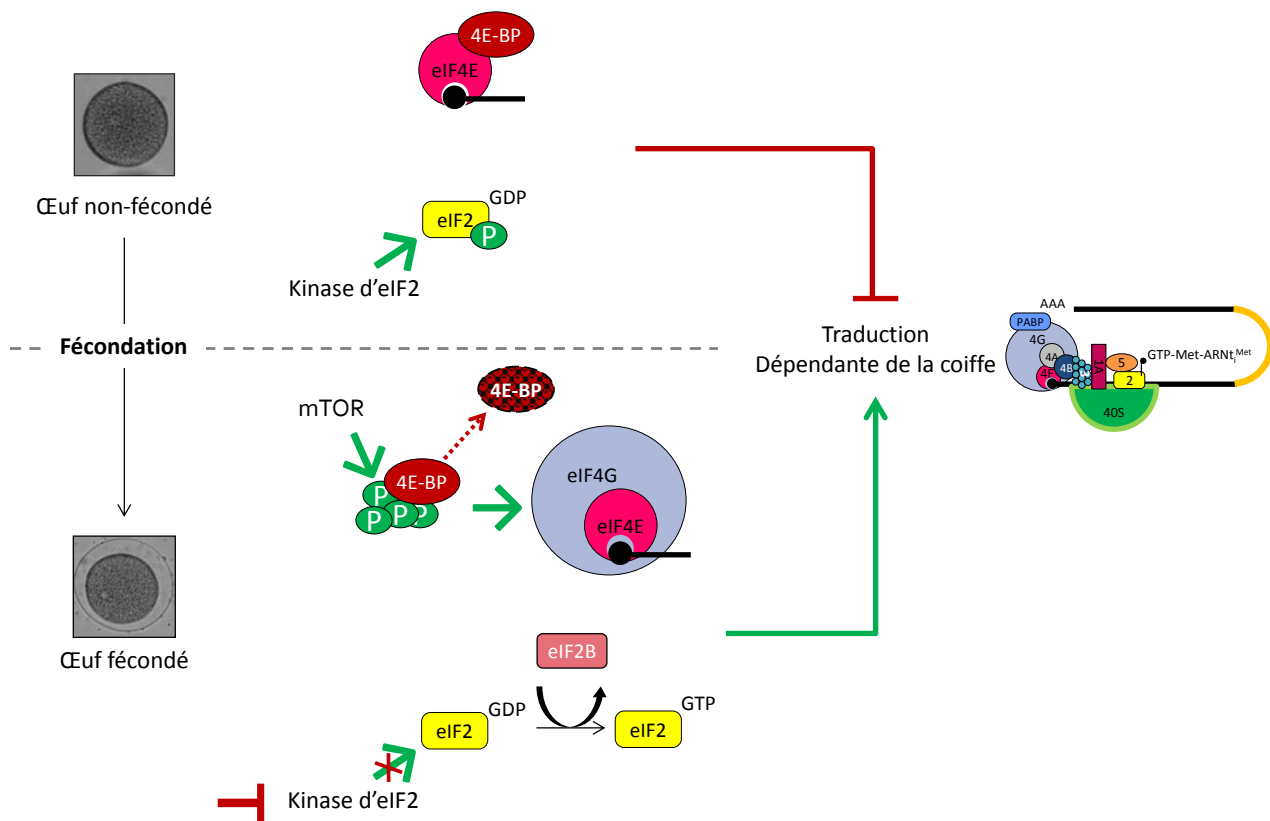


Figure 29 : Régulations traductionnelles à la fécondation de l'embryon d'oursin. Avant la fécondation eIF4E et eIF2 sont inhibés, respectivement par 4E-BP et par la phosphorylation de la sous-unité α d'eIF2. L'initiation de la traduction dépendante de la coiffe est alors inhibée. A la fécondation, les deux inhibitions sont levées sous l'action de la voie mTOR pour eIF4E, et par inhibition des kinases d'eIF2 α . Les complexes eIF4F et ternaire se forment, activant la traduction dépendante de la coiffe.

3.2.3.2. *Utilisation des messagers maternels*

La fécondation active différents facteurs d'initiation. La machinerie traductionnelle est alors fonctionnelle, et peut s'engager dans la traduction des messagers maternels stockés. L'augmentation de synthèse protéique après la fécondation est directement reliée au recrutement des ARNm maternels dans les polysomes (Humphreys, 1971) et à la quantité de ribosomes formant ces polysomes. Dans les œufs non-fécondés, moins de 1% des ribosomes sont dans les polysomes, tandis que 2h après la fécondation, il y a environ 25% des ribosomes dans les polysomes (Davidson, 1986). Cette proportion augmente jusqu'à atteindre 60% en blastula. L'augmentation du taux de polysomes corrèle avec l'augmentation globale de synthèse protéique que l'on observe après une incorporation de [³⁵S]-méthionine. L'analyse du profil de synthèse protéique globale n'a pas montrée de différence qualitative avant et après la fécondation. Pourtant, il semble que tous les ARNm maternels ne soient pas recrutés de manière égale dans les polysomes.

Les protéines néosynthétisées à la fécondation suivent différents schémas d'expression, en fonction de la nécessité de la protéine à un instant donné (Kelso-Winemiller et al., 1993). Certains ARNm sont rapidement recrutés dans les polysomes tandis que d'autres sont recrutés plus lentement. Selon les auteurs, un niveau d'affinité variable des RBP ou des éléments de la machinerie traductionnelle pour les ARNm pourrait expliquer la mobilisation plus ou moins rapide des messagers dans les polysomes.

L'étude de L. Kelso-Winemiller démontre l'existence de deux classes d'ARNm sujettes à des régulations distinctes au cours du développement embryonnaire précoce. La première classe correspond aux ARNm spécifiques des premiers clivages rapides, la seconde aux ARNm nécessaires après ces premiers clivages (respectivement CSS et PCS pour *Cleavage-Stage Specific* (<12 h.p.f) et *Post-Cleavage Stage* (>12 h.p.f)). La distinction entre les deux catégories se fait à deux niveaux, l'abondance de l'ARNm d'une part, et le recrutement polysomal d'autre part. A la fécondation, les ARNm CSS sont en moyenne cinq fois plus abondants dans la cellule que les ARNm PCS. Trente minutes après la fécondation, les ARNm CSS sont à plus de 70% dans les polysomes quand les ARNm PCS ne sont recrutés qu'à hauteur de 20% environ.

Les auteurs proposent qu'il y ait une traduction privilégiée des ARNm CSS à la fécondation, car les protéines qui en sont issues sont essentielles aux divisions cellulaires

rapides. En outre, que la cellule puisse faire la distinction entre la traduction d'ARNm essentiels et non-essentiels aux premières divisions est un sérieux avantage, particulièrement en terme de gain énergétique.

Parmi les messagers maternels précocement traduits à la fécondation, les tubulines α (Alexandraki and Ruderman, 1985a; Alexandraki and Ruderman, 1985b), Nek A (*Never In Mitosis A [NIMA]-related kinase A*) (Le Breton et al., 2003), la petite sous-unité régulatrice R2 de RNR (*RiboNucléotide Réductase*) (Standart et al., 1985), et les Cyclines A et B (Kelso-Winemiller et al., 1993) ont déjà été identifiées ; ces cinq protéines étant impliquées dans le cycle cellulaire.

Les tubulines α s'associent pour former les microtubules, indispensables à la formation du fuseau mitotique.

La Ser/Thr kinase Nek A est une protéine orthologue des kinases Nek de mammifères. Les Nek sont impliquées dans l'organisation du réseau de microtubules et dans le contrôle de la progression mitotique (revu dans (Fry et al., 2012)). Chez l'oursin, le recrutement d'un certain nombre de messagers dans les polysomes est dépendant de l'activité du complexe CDK1/Cycline B (Le Breton et al., 2003). Par la suite l'un de ces messagers a été identifié comme codant pour la protéine Nek A spécifique de l'oursin.

RNR est nécessaire à la synthèse des dNTP, indispensables à la réplication de l'ADN. L'œuf d'oursin contient suffisamment de dNTP pour seulement deux cycles. L'activité de RNR est donc essentielle au bon déroulement des premiers cycles. La petite sous-unité R2 de RNR est néosynthétisée à la fécondation, et s'associe à la grande sous-unité déjà présente dans l'ovocyte, permettant une activation de RNR pour la synthèse de dNTP. C'est donc la néosynthèse de la petite sous-unité régulatrice R2 qui va conférer à RNR son activité à la fécondation.

Les cyclines, avec leurs sous-unités catalytiques CDK contrôlent la progression dans le cycle cellulaire. A l'instar de la grande sous-unité de RNR, les CDK sont déjà présents dans l'œuf non-fécondé, et c'est la synthèse de la sous-unité régulatrice du complexe qui est déterminante pour le cycle. A la fécondation, l'ARNm est recruté dans les polysomes (Kelso-Winemiller et al., 1993), et la protéine s'accumule (Evans et al., 1983).

Cependant, d'autres protéines ne sont traduites que bien plus tard (Bédard and Brandhorst, 1986; Kelso-Winemiller et al., 1993), c'est notamment le cas de l'Hsp 90 (*Heat shock protein 90*) qui n'est synthétisée qu'au stade blastula.

Exception faite du recrutement particulier de ces quelques messagers dans les polysomes (Kelso-Winemiller et al., 1993; Standart et al., 1985), le modèle communément admis serait plutôt une hausse globale du métabolisme de l'embryon, conduisant à une augmentation généralisée de la traduction (Bédard and Brandhorst, 1983; Brandhorst, 1976; Roux et al., 2008). Cette hypothèse a été renforcée par le fait que les quelques protéines codées par les ARNm recrutés à la fécondation n'ont pas été détectées en gel bidimensionnel. Les variations observées concernant des messagers abondants (Cyclines A/B, R2) seraient uniquement dues à l'abondance de l'ARNm maternel stocké. Les connaissances actuelles sont schématisées dans la **Figure. 30**.

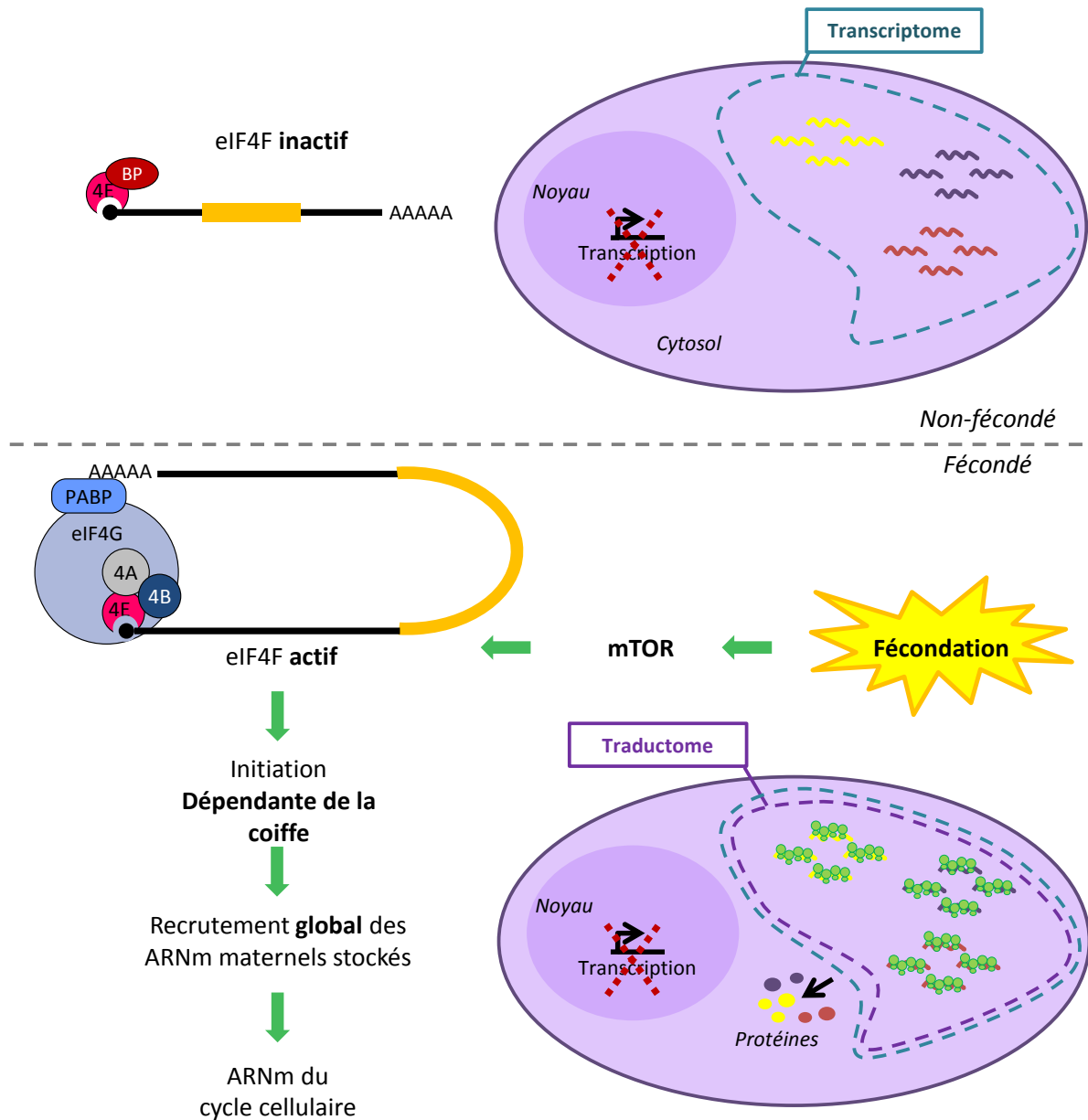


Figure 30 : Schéma bilan des connaissances actuelles concernant l'augmentation de synthèse protéique à la fécondation chez l'oursin. Dans l'œuf non-fécondé (haut), la transcription est quasi-nulle, les ARNm sont stockés dans le cytoplasme et le complexe eIF4F est inactif, notamment par séquestration d'eIF4E par 4E-BP. Dans l'œuf fécondé (bas), la fécondation stimule l'activité de la voie mTOR, levant l'inhibition médiée par 4E-BP, rendant le complexe eIF4F actif. L'initiation de la traduction dépendante de la coiffe se met en place, donnant lieu à un recrutement global dans les polysomes des messagers maternels stockés, les ARNm traduits étant majoritairement impliqués dans le cycle cellulaire.

4. Objectifs de la thèse

Cette introduction a permis de rappeler que l'expression des gènes peut être régulée à différents niveaux au sein de la cellule, de l'ADN jusqu'à la protéine. Pendant de nombreuses années, l'essentiel des variations d'expression géniques ont été attribuées aux régulations transcriptionnelles. Néanmoins, il est à présent établi que d'autres niveaux de régulations existent, en amont comme en aval de la transcription, la régulation traductionnelle étant une étape clé dans la régulation de l'expression des gènes. Elle a longtemps été négligée, et encore aujourd'hui, la plupart des études portent sur le transcriptome, soit l'ensemble des messagers présents au sein de la cellule. Toutefois, par le biais de multiples régulations, seuls certains d'entre eux sont effectivement traduits en protéines, et correspondent au traductome.

La notion de traductome donne la dynamique des messagers traduits en protéines à un instant t dans un type cellulaire donné, reflétant la lecture fonctionnelle du génome. La gestion spatio-temporelle de la traduction nécessite des régulations extrêmement fines, cruciales pour un métabolisme et une prolifération cellulaire contrôlés, à l'image du développement embryonnaire précoce. Il s'agit d'un excellent modèle d'étude des régulations traductionnelles dans un contexte contrôlé, connaissances transposables à des phénomènes non-contrôlés, tels que la cancérisation.

L'embryon d'oursin est un modèle particulièrement adapté à l'étude du lien entre les régulations traductionnelles et le premier cycle cellulaire mitotique. En effet, l'augmentation de la synthèse protéique est indispensable pour l'entrée en cycle et le départ du développement embryonnaire. Or, celle-ci est indépendante de la transcription et uniquement basée sur l'utilisation des messagers maternels stockés dans l'ovocyte. L'étude des transcrits prioritairement traduits est fondamentale dans la compréhension des régulations traductionnelles impliquées dans le premier cycle cellulaire et dans le développement précoce de l'embryon d'oursin.

A ce jour dans l'embryon d'oursin, aucune sélectivité de traduction n'a été démontrée. L'idée générale étant que les variations d'expression sont dues à la quantité initiale de chaque ARNm dans les œufs non-fécondés, qui varie en fonction du messager. La Cycline B et la

petite sous-unité R2 de RNR en sont de parfaites illustrations : les ARNm sont très abondants avant la fécondation, et ils sont très fortement traduits après la fécondation.

Chez le Xénope, la polyadénylation joue un rôle essentiel dans le recrutement polysomal. Cependant, chez l'oursin, l'augmentation de polyadénylation est insuffisante pour expliquer le contrôle traductionnel ayant lieu à la fécondation et nécessaire à l'entrée en mitose. La régulation traductionnelle originale de l'embryon d'oursin est le résultat de la libération du facteur eIF4E de sa séquestration par 4E-BP (Cormier et al., 2001; Salaün et al., 2003). De la même manière que dans les cellules en culture, où la modification de la disponibilité d'eIF4E influe sur le recrutement polysomal sélectif (Mamane et al., 2007), il est légitime de se poser la question d'une régulation sélective de la traduction des ARNm stockés dans ce contexte physiologique.

Ainsi, ce projet de thèse s'intègre dans ce contexte, par l'identification des messagers maternels traductionnellement régulés à la fécondation chez l'oursin, ainsi que par l'analyse des mécanismes régulateurs affectant le recrutement polysomal. Dans un premier temps, le travail a consisté en l'optimisation du protocole de polysome profiling chez l'oursin, ce qui a conduit ensuite à une étude spécifique des régulations traductionnelles de la Cycline B dans les deux espèces d'oursins européens *P. lividus* et *S. granularis*. Par la suite, nous avons établi le traductome en réponse à la fécondation, soit l'identification globale des messagers maternels recrutés précocement dans les polysomes. Puis l'étude de l'implication de la voie de signalisation mTOR dans le recrutement polysomal de messagers identifiés dans le traductome a été menée. D'autre part, et au vu des résultats précédents, les régulations traductionnelles subies par les facteurs du complexe eIF4F ont été également analysées. Les résultats seront présentés sous forme d'articles, dans l'ordre suivant :

- Optimized polysome profiling in sea urchin (*Article de Méthodologie*)
- Cyclin B mRNA recruitment into polysomes at sea urchin fertilization depends on mTOR activity
- Translatome analysis at oocyte-to-embryo transition in sea urchin
- Translational control of translation factors at sea urchin fertilization

Ainsi, ce travail s'est intéressé à la compréhension des mécanismes à la base de l'expression protéique à la fécondation.

Résultats

1. Article 1

« Optimized polysome profiling in sea urchin »

Chassé, H.*, Boulben, S.*, Costache, V., Cormier, P., Morales, J., (2015)

Soumis à NAR Methods

Le polysome profiling est une technique qui est souvent décrite comme fastidieuse, lourde et avec de nombreux points critiques, ce qui peut être un frein pour les chercheurs ne maîtrisant pas cette méthode. Pourtant, elle présente un certain nombre d'avantages par rapport aux alternatives que sont le ribosome profiling et le TRAP. En effet, utiliser le polysome profiling permet de déterminer avec précision le niveau de traduction d'un ARN messager, et s'il est associé à du séquençage, il permet d'avoir accès aux régions non-codantes des ARNm, souvent régulatrices. D'autre part, le polysome profiling n'est pas une technique conditionnée par la présence de données génomiques, et peut donc être utilisée pour l'étude des régulations traductionnelles d'espèces non-modèles, n'ayant pas encore de génome séquencé.

Le polysome profiling est une technique qui a été développée dans les années 1960. Très vite, les équipes travaillant sur l'embryon d'oursin l'ont utilisée afin d'appréhender les régulations traductionnelles ayant lieu à la fécondation. Sommairement, le polysome profiling nécessite l'utilisation d'un gradient linéaire de sucrose sur lequel est déposé le surnageant du lysat cellulaire d'intérêt. Après ultracentrifugation, les éléments sont séparés dans le gradient en fonction de leur coefficient de sédimentation. Ensuite, le gradient est fractionné, les ARN de chaque fraction sont extraits. Les messagers peuvent être analysés par une approche génomique comme par une approche haut-débit.

Ce premier travail a eu pour objectif la mise en place d'un protocole efficace, reproductible et adaptable aux analyses haut-débit pour l'étude du recrutement polysomal

chez l'oursin. Dans cet article, nous nous sommes attachés à présenter clairement chacune des étapes du protocole, à développer systématiquement les raisons qui nous ont poussées à choisir une option plutôt qu'une autre, et à souligner les points critiques auxquels le chercheur peut être confronté, tout en proposant différentes adaptations possibles. Enfin, l'acquisition récente de l'appareil KingFisher Flex par le laboratoire nous a permis d'adapter la méthode pour une utilisation haut-débit, avec des résultats qui sont identiques à ceux obtenus manuellement. L'article se termine par une illustration de la méthode montrant le recrutement polysomal et la traduction active d'ARNm maternels précédemment identifiés dans la littérature comme traduits et recrutés à la fécondation chez l'oursin.

La méthode mise au point dans cet article est celle qui a été utilisée pour les études menées par la suite dans le cadre de ce travail de thèse, en particulier pour l'établissement du traductome de l'embryon d'oursin à la fécondation.

Optimized polysome profiling in sea urchin

Chassé H.^{*1,2}, Boulben S.^{*1,2}, Costache V.^{1,2¶}, Cormier P.^{1,2} and Morales J.^{1,2 #}

1- CNRS, UMR 8227, Laboratory of Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, F-29688, Roscoff cedex, France ; 2- Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 8227, Laboratory of Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, F-29688, Roscoff cedex, France

* joint first authors

¶ present address : Laboratoire Biologie du Développement, UMR7009, CNRS, UPMC, 181 Chemin du Lazaret, Observatoire Océanologique, 06230 Villefranche-sur-Mer France.

corresponding author : morales@sb-roscoff.fr

Abstract

During the past decade there has been an increasing interest for the role of translational regulation in gene expression in many organisms. Polysome profiling is one of the classical techniques developed to infer the specific mRNA translation or to analyze the translational state, which corresponds to the subset of mRNAs actively translated in a cell. Polysome profiling is especially suitable for emergent model organisms where genomic data are limited.

In this paper, we describe an optimized protocol to purify sea urchin polysomes and present experimental results on translational regulation of mRNAs following fertilization, highlighting the critical steps of polysome purification. In addition we present evidence for adaptation of the protocol to high-throughput processing of polysome gradient fractions, which will allow simultaneous screening of multiple biological conditions and large-scale preparation of samples for NGS applications.

This protocol should help investigators interested in integrating the role of translational regulation in the gene regulatory networks to do so in their favorite model.

Keywords: polysome profiling / translational control / high-throughput processing

1. Introduction

Gene expression regulation is exerted at many levels, from epigenetics and transcription to post-translational modifications of the proteins. Among the regulatory levels, the translational regulation is the most tightly regulated one, being critical for protein production in response to a number of physiological and pathological situations (1, 2). Furthermore, almost half of the variation of protein concentration is due to translational control (3). Studying translation leads to a better understanding of gene expression regulation and can explain the differences between transcriptomics and proteomics analyzes (4–8): the subset of mRNAs actively engaged into translation, also coined as *translatome*, reflects the functional readout of the genome at a given time in a given cell type. There are different techniques to study specifically the translated mRNAs. Polysome profiling is the classical standard for translation analysis; this technique is based on sucrose gradient separation of translated mRNAs, which are associated to polysomes, from untranslated ones. Recently, new techniques have emerged such as ribosome profiling (9) and ribosome affinity purification (TRAP) (10). The ribosome profiling allows the purification of ribosome-protected fragments of the mRNA (~30nt), giving the foot-print of the ribosome on messengers RNA, and the dynamics of the translation. The TRAP allows the specific target of tagged-ribosomes-associated mRNAs, which is suitable to analyze translation in a specific cell type. Advantages and drawbacks of each technique are reviewed in (11). Polysome profiling is especially suitable for model organisms where genomic data / tools are scarce, and where genetic manipulations are not possible. Indeed it allows identification of the translated full-length mRNAs (coding and untranslated regions). The translation rate is associated with the number of ribosomes translating simultaneously the same mRNA. The highest the sedimentation coefficient is in the sucrose gradient, the more ribosomes are on the RNA messenger, and the more this mRNA is translated. Finally, the samples can be used for targeted analyzes (12–14) as well as for holistic analyzes (11, 15–17). However, the broad application of polysome profiling has been slowed by complexity and the difficulty to adapt the protocol for simultaneous analyzes of multiple biological conditions. Here we provide an optimized protocol to purify sea urchin polysomes that should ease the polysome purification in other unconventional model organisms. Furthermore we provide an automated purification method using paramagnetic particles-technology that should allow the purification of polysomes fractions in a 96-wells format.

Sea urchin early developmental stages are subjected to well-described translation regulation, stored maternal mRNAs being progressively used during the first cell cycle

cleavages, without any significant increase of transcription (18–20). Polysome protocols in this model were described in the 80-90's (21, 22), but were not used recently in the light of the recent molecular biology techniques that allow in-depth investigation of specific mRNAs translational status. We optimized each step (lysis buffer, lysis conditions, RNA purification, *etc.*) to obtain reproducibly good quality RNAs from polysome gradients. In this paper, we present an optimized protocol to purify sea urchin polysomes. We also include advices and tips for the different critical points, including the polysome disruption, which could help the reader to adapt this protocol to his/her favorite model organism. In addition we present an adaptation for high-throughput processing of polysome gradients fractions, which will allow simultaneous screening of multiple biological conditions and large-scale preparation of samples for next-generation sequencing (NGS) applications. Finally we present biological data on the polysomal recruitment of selected mRNAs triggered by fertilization of sea urchin eggs.

2. Method

2.1. Overview

Polysome profiling involves the separation on a sucrose gradient of translated mRNAs depending on the number of bound ribosomes. Cells are lysed and loaded on the top of the 15-40% sucrose gradient. After an ultracentrifugation, the gradient is monitored at A_{260} with a flow cell coupled with a spectrophotometer and fractionated into equal fractions: untranslated mRNAs (top fractions) are separated from polysomes-associated mRNAs (bottom fractions). Fractions are then processed for RNA extraction, either manually by phenol/chloroform purification, or in a 96-wells format using an automated RNA purification processor allowing the simultaneous treatment of several gradients. The translational status of a given mRNA is analyzed by RT-PCR amplification and relative quantification in each fraction. Alternatively, the content of polysomal fractions can be identified using global analysis (such as high-throughput sequencing) to give access to the cell translome. A visual overview of the method is presented in Fig. 1.

2. 2. Detailed method

2.2.1 Sample collection

Experiments were performed with *Paracentrotus lividus* or *Sphaerechinus granularis* sea urchins, the experiments shown correspond to *P. lividus* samples. The animals were collected in the bays of Crozon or Concarneau (Brittany, France). Gametes were obtained by intracoelomic injection of 1ml acetylcholine 0.1M. Eggs were collected in filtered sea water (FSW), filtered on hydrophilic gauze and washed twice in FSW by centrifugation 2min at 780g (Heraeus, Labofuge 400 with swinging buckets). Eggs were maintained at 5% (cells/volume) in FSW. Eggs were treated with 7 μ M citric acid to remove the jelly coat, and rinsed in FSW. Sperm was collected on a Petri dish and stored at 4°C until use. Extemporaneous dilution in FSW (10 μ l of sperm in 1ml of FSW) activates sperm for fertilization. Ten \square l of the diluted sperm was added per ml of egg suspension. Only batches of embryos displaying a fertilization and division rate above 95% were used.

2.2.2 Cell lysis

Eggs or embryos were collected in FSW by brief centrifugation (1min at 195g, Heraeus, Labofuge 400 with swinging buckets), and the pellet was resuspended in 4 volumes of cold lysis buffer (10mM Tris pH 7.4; 250mM KCl; 10mM MgCl₂; 25mM EGTA; 0.4% Igepal; 5% sucrose; RNase-free water and extemporaneously 1mM DTT; 10 μ g/ml Aprotinin; 2 μ g/ml Leupeptin; 100 μ g/ml Emetin; 40U/ml RNase inhibitor). Lysis was done in a Dounce homogenizer using 10 strokes of type B pestle. All steps were done at 4°C, on ice or in cold room. The lysate was then centrifuged for 10min at 16,000g in a tabletop centrifuge. The supernatant was carefully transferred into a new microtube. Samples can be frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until further use for polysome fractionation.

Critical steps for cell lysis

Optimization steps of the protocol presented above for sea urchin oocytes and embryos are detailed below and suggestions are made for adapting this protocol to other models/organisms.

A cytoplasmic RNA integrity check is recommended before proceeding to polysome profile analysis. In our experiments, aliquot from the supernatant was taken for checking the cytoplasmic RNA quality. RNA was purified by acid phenol/chloroform extraction and resolved on a TBE/agarose gel electrophoresis, to verify that there was no degradation:

ribosomal RNA bands should be sharp, a 28S/18S ratio of >2 is an indication that the purified RNA is intact. Quality can be further determined by a Bioanalyzer. The RNA Integrity Number (RIN), which gives a measurement of the degree of degradation, should ideally be close to 10, corresponding to intact RNA.

We observed that RNA quality is improved when the lysates are prepared with fresh eggs rather than on a frozen egg pellet kept at -80°C (Fig. 2, lanes A and B). Alternatively, freezing and pulverization under liquid nitrogen prior to lysis is working for organisms with cell walls or for solid tissues (13, 23). Lysates can be kept frozen at -80°C until use, without detectable loss of RNA integrity.

The eggs pellet/lysis buffer volume ratio was optimized in our conditions to obtain a lysate concentrated enough for subsequent polysome purification, without losing RNA quality (Fig. 2 lanes B-E). The optimal ratio was one volume of egg pellet to 4 volumes of lysis buffer (1:4; Fig. 2 lane E). The lysate concentration is measured by absorbance at 260nm in a UV spectrometer, and is typically around 30 $\text{OD}_{\text{A}260}$ per ml. The lower extra-bands observed in lanes A, B, C, D and E correspond to 18S and 28S degradation products.

Two lysis techniques have been tested: a mechanical shearing through a 25G needle (used routinely for protein lysates in our lab) and Dounce homogenization. In our experiments, the use of a Dounce tissue grinder improved RNA quality (Fig. 2, compare lanes E and F). Using a 7ml-Dounce with the tight pestle (B), allowing a distance of 20-55 μm between the pestle and the cylinder, we were able to lyse cells without breaking the nucleus to isolate cytoplasmic RNA: sea urchin eggs measure around 100 μm in diameter, whereas the nucleus measures less than 20 μm . The correct lysis of the eggs has been checked under a microscope, and 10 strokes are needed to obtain 100% of lysed cells.

Sea urchin oocytes and embryos contain a high nuclease activity dependent on Ca^{++} ions (24, 25) and should be washed in Ca^{++} free sea water (see composition in (25)), prior to the lysis step. In our hands and in the two species we used, this step did not significantly improve the quality of RNA (Fig. 2 lanes F, G, H). However, inclusion of EGTA (25, 26) in the lysis buffer improved the quality but also the reproducibility of the quality of RNAs in the lysates (Fig. 2, compare lanes F and I). We noticed also that the high salt buffer preserves RNA integrity, therefore KCl was included in the buffer at 250mM for the sea urchin lysates.

To avoid polysome dissociation by run-off effect when preparing the lysates, a protein synthesis inhibitor that freezes translating polysomes is often used in lysis buffers and when possible before collecting samples. Cycloheximide is the most common used inhibitor in polysome profiling protocols described for mammalian cells (13). In sea urchin embryos,

cycloheximide is not working, however emetine is a very efficient protein synthesis inhibitor (27). We therefore included emetine (100µg/ml) in eggs or embryos culture five minutes before sample collection, and in the lysis buffer.

Additional detergent can be used in the lysate buffer, such as CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) (28) and deoxycholate (13, 29). RNase inhibitors such as heparin or VRC (Vanadyl Ribonucleoside Complex) (13, 30) can be used as well, to inhibit RNases activity. A combination of anti-proteases (aprotinin and leupeptin for example) or a commercially available anti-proteases cocktail is necessary to avoid protein degradation and enhance polysome quality.

2.2.3 Polysome fractionation

Sucrose density gradient formation

Lysates obtained as described above were loaded on a 15-40% linear density sucrose gradient. Two 15% and 40% sucrose buffers were prepared in 10mM Tris pH 7.4; 10mM MgCl₂; 250mM KCl; 25mM EGTA; 1mM DTT. To obtain a linear gradient, we used the Gradient Master device (BioComp) equipped with holder fitting tubes adapted for SW41 rotor. Six ml of each sucrose buffer were used per gradient. In the ultracentrifuge tube, the light sucrose solution was underlayered with the heavy sucrose solution, using a canula attached to a 10ml syringe. The introduction of air bubbles or mixing of the two solutions should be carefully avoided during this step. The “*SW41 Short Gradient*” program with the corresponding range of sucrose percentage is run following the manufacturer’s instructions. Program lasts a few minutes (2’21” for a 15-40% gradient) and produces up to six reproducible linear gradients in one run. Once made, the gradients should be handled with care and kept at 4°C for at least one hour. The percentage of sucrose used for linear gradients can be adjusted to address optimized separation of polysomal fractions according to the biological sample or question.

Sample loading and ultracentrifugation

Before loading the lysate on the sucrose gradient, the absorbance at A_{260nm} was measured in the samples. Using the protocol described above, our samples usually had a concentration between 20 and 40 OD_{A260}/ml. When comparing two biological conditions, the same amount of material (equivalent OD_{A260}) should be loaded on top of each gradient. The maximum volume of lysate that can be deposited on the gradient is 500µl sample, with a

maximum of 25 OD_{A260}. In our hands, a better separation between 40S, 60S and ribosome peaks was obtained when 10 OD_{A260} were loaded on the gradient, corresponding usually to 350µl of lysate. When loading, one should not disturb the sucrose gradient, which is best achieved by gently pipetting the lysate onto the top of the gradient. Then, the gradient tubes are carefully balanced before starting the ultracentrifugation run. The run should take 2.5 hours at 38,000 rpm in a SW41 Ti rotor at 4°C. The acceleration must be maximal. To avoid any disturbance, the deceleration must be minimal. Once the ultracentrifugation run is finished, the gradients are kept at 4°C and should be fractionated immediately.

Polysome gradient profile and fractions collection

During gradients centrifugation, the ISCO density gradient fractionation system is set up according to the manufacturer. The ISCO Density Gradient System is equipped with a spectrophotometer with a 254nm filter, and produces a continuous absorbance profile as the gradient is collected. Fractionation is performed by introducing a dense chase solution into the bottom of the centrifuged tube by piercing the bottom of the tube, raising the gradient intact by bulk flow. We use 50% sucrose solution as chase solution. Before each experiment, the entire system was washed first with NaOH 0.1M, then thoroughly with DEPC-treated water. Then the system is filled with 50% sucrose solution, absorbance baseline is set following the manufacturer's manual (see UA-6 protocol). In our experiments, the peristaltic pump is set at a speed corresponding to 0.9ml/min.

After centrifugation, the centrifuge tube is connected to the flow cell and the piercing apparatus. The 50% sucrose chase solution is injected by punctuation of the tube from the bottom, and it pushes out the gradient in a continuous manner through the flow cell. Fractions were kept on ice while collected to avoid any RNA degradation. The introduction of air bubbles in the system should be avoided, as bubbles will disturb the gradient. Typical polysome profile (Fig. 1, step 3) shows first a peak of A₂₅₄ absorbing material, containing the untranslated mRNAs, then the two peaks of the small and large ribosomal subunits, the monosome peak, and finally polysomal peaks. Polysome profiles can vary according to the general translation activity. Polysomal peaks are more prominent in highly translationally active cells. For example in sea urchin unfertilized eggs, less than 2% of the ribosomes are engaged in polysomes, and polysome peaks are barely detectable (18). After fertilization, protein synthesis activity increases, and the proportion of ribosomes in polysomes increase as development proceeds (Fig. 3).

RNA purification and profiles

The RNAs of each fraction were extracted with one volume of acid phenol-chloroform (vol:vol), and precipitated with one volume of isopropanol. Ethanol/sodium acetate precipitation cannot be used, because of the too high level of sucrose in the last fractions. RNAs were pelleted in a tabletop centrifuge at 16,110g for 10min at 4°C, washed with 70% ethanol, pelleted again and air-dried for 20min (care should be taken to remove the ethanol wash). RNAs from each fraction were resuspended in the same volume of RNase-free water (one twentieth of the original fraction). An aliquot of each fraction was used for RNA quality check on agarose gel electrophoresis. A typical RNA profile of the 15-40% sucrose gradient separated on agarose gel electrophoresis is represented in Fig. 4A. In the first fractions, only low molecular weight RNAs are visible, then fractions containing only 40S subunits are isolated as shown by the presence of the 18S rRNA band, followed by the 60S peak, as shown by the 28S rRNA band. In the middle of the gradient, the bands are more intense, due to the important part of monosomes. Starting from fraction #13, the 28S and 18S RNAs are present with a 28S:18S ratio equal to 2:1, representing polysomal fractions. On average, typical RNA yields are 25ng/μl per individual polysome fraction in sea urchin.

Protocols often advise to use proteinase K treatment before RNA extraction (10mM Tris pH8, 1mM EDTA, 0.5% SDS and 200μg/ml proteinase K, for 25min at 50°C) to enhance recovery of RNAs from polysome gradients (31). Although it might help for specific samples, in our hands, the proteinase K treatment did not significantly improve the RNAs quality and quantity from sea urchin polysome gradients (data not shown). Isolation of RNA of sufficient quality for RNA-Seq analysis is achieved by double precipitation of RNAs isolated from polysomes fraction, using first isopropanol precipitation, then ethanol/sodium acetate precipitation. The RNA profiles, the RINs and the libraries obtained for RNA-Seq following this protocol are shown in Fig. S1.

2.2.4 High-throughput processing of polysome fractions RNA purification

To allow the purification of polysome fractions in a 96-wells format and avoid the use of hazardous materials such as phenol in large quantities, we used automated purification using paramagnetic particles-technology, such as the « Pure RNA tissue kit » designed for the KingFisher Flex platform (Thermofisher Scientific). Each fraction is mixed with an equal volume of chaotropic salt-containing solution provided in the kit, and processed as suggested by the manufacturer. A comparison of the manual *versus* automatized RNA purification is

presented Table I. One 96-wells plate containing up to four gradients (22 fractions each) can be processed in less than two hours, and yields RNA ready for subsequent steps. Sucrose gradients processed this way yielded an equivalent amount of final RNA, with comparable quality (see below, §3). Therefore the use of an automated RNA purification following gradient fractionation as described above should facilitate large-scale and/or genome-wide approach of translation analysis.

2.3. Analysis of the translational status of mRNAs

A critical point of translation analyzes is to verify that mRNAs present in polysome fractions are associated to translating polysomes and are not co-migrating with polysomes. Untranslated mRNAs are associated in the cell with RNA-binding proteins in so-called messenger ribonucleoproteins (mRNPs) or with stalled polysomes, which might sediment in the same fractions as polysomes when purified on sucrose gradients (18, 32). To distinguish between active polysomes and co-migrating mRNPs or stalled polysomes, treatment by a polysome disrupter prior to polysome purification is applied. The two principal and classical disrupters used are EDTA and puromycin. EDTA chelates Mg^{2+} ions, and dissociates the subunits of the ribosome. EDTA is added after lysate preparation, prior to gradient loading. Gradient should also be supplemented with EDTA and prepared without Mg^{2+} . As EDTA could potentially impact mRNPs, which formation might depend on Mg^{2+} , the antibiotic puromycin is usually preferred. Puromycin provokes the dissociation of the ribosomes in the elongation step of translation, and only impacts active polysomes (33). The puromycin can be added *in vivo* prior lysis (0.6mM in sea urchin eggs or embryo culture) or *in vitro* after lysate preparation (2mM in lysate), when samples are not easily available for puromycin *in vivo* incubation (21, 34). In both cases the lysate is supplemented with 500mM KCl, incubated 15min at 4°C then 15min at 37°C before loading on the sucrose gradient (34).

EDTA treatment disrupts the gradient profile (Fig. 4C), with an important loss of RNAs integrity: they migrated mostly as smears (Fig. 4D). Adding more RNase inhibitor to lysates and in the sucrose gradient improved RNA quality (data not shown). In contrast, gradient profile was less affected by puromycin treatment (Fig. 4E and G). The use of puromycin either *in vitro* or *in vivo* did not affect rRNA quality after purification (Fig. 4F and H). rRNAs from polysome fractions shifted toward lighter fractions in puromycin-treated lysates compared to control lysates (Fig. 4, compare F and H with B). We therefore used the puromycin treatment for assessing translation of a specific mRNA.

The translational status of a specific mRNA can be assessed by Northern blot or RT-PCR following polysomal profiling. Once the RNAs have been separated in free *versus* polysome-associated mRNAs by polysome gradients as described above, one can analyze whether a specific mRNA is translated, using the proper puromycin controls. After RNA purification, an equivalent aliquot of each fraction is used for reverse transcription. The presence of the mRNA can be detected in each fraction, and after quantification of the signal, specific mRNA repartition was expressed as a percentage of total signal. An illustration of this approach is given below in §3, by analyzing the translational status of mRNAs before and after fertilization in sea urchin.

2.4. Holistic approach

The major limitation of the polysome analysis by RT-PCR (or Northern blots) is that only a modest number of mRNAs can be analyzed simultaneously. A holistic approach is possible, using pooled polysomal fractions to identify the translational status of all mRNAs present in the cell by microarrays or NGS analysis, often on model organisms where genomic tools are available (11, 15). Access to NGS has become easier and less expensive, allowing researchers working on emerging models or on models with poor genome data available to turn to large-scale analysis of gene expression, largely at the transcriptional level (transcriptomes). However, transcriptome data incompletely reflect the functional subset of mRNAs (16), therefore an “omics” assessment of translation will allow dissection of translational gene expression programs in development, abiotic and biotic stress, or ecological niches. Ribosome profiling, despite the prominent recent advance in the field of translation (9), relies on the availability of genomic data to map the relatively short (30 nt) ribosome-protected fragments generated by the protocol. Interestingly, the purification by polysome profiling of mRNAs associated to polysomes grants access to full-length mRNAs: therefore identification of transcripts and more importantly of their untranslated regions is made possible using *de novo* assembly of NGS data. Nonetheless polysome profiling is a labor-intensive procedure, and each gradient yield several fractions that increase the number of samples to handle, especially for the purification of RNAs. The amount of RNAs varies widely with the biological samples and may necessitate performing several gradients per condition to obtain enough polysomal RNA for NGS library construction. Furthermore NGS requires a high quality RNA for optimal library construction and downstream sequence assembly. High-throughput processing of polysome fractions RNA purification, as described above in §2.2.4, should facilitate holistic approaches of polysome profiling.

3. Translation following fertilization in sea urchin

In this paper, we illustrate in sea urchin the use of polysome profiling to analyze the translational status of specific mRNAs by semi-quantitative RT-PCR analysis on individual fractions of the polysome gradient, as described in (35).

Early embryonic development, especially oocyte-to-embryo transition, is a powerful stage to study translational regulation (for instance in mouse (14, 36) or drosophila (17)). During the oocyte maturation, maternal mRNAs are stored in the cell. The early stages of development following fertilization are only based on the translation of those stored maternal mRNAs, independently from transcription (37). One of the advantages of the sea urchin model is that, unlike more classical models (mammals, nematodes, insects, fish or amphibians) where the fertilized oocyte has to finish its meiotic maturation, eggs have completed their meiotic maturation and are physiologically blocked in G1-phase. The changes observed in terms of mRNA translation are directly correlated to the first embryonic cycles and the early development (18, 20, 22, 38–40). In sea urchin, several mRNAs are translated at fertilization: Cyclin A (38), Cyclin B (22) and the small subunit R2 of the Ribonucleotide Reductase (41). We used as a negative control the maternal mRNA eIF4A, that have been previously identified as untranslated shortly after fertilization in mouse (14). The *P. lividus* sequences for the four mRNAs were retrieved by tblastn searches in the *P. lividus* transcriptome databases (<http://octopus.obs-vlfr.fr>) using the homologous human (NCBI) and *S. purpuratus* (<http://Echinobase.org>; (42)) protein sequences. Primers were designed using Primer3 webtool (Fig. S2).

Equal RNA volumes of each polysome gradient fraction were reverse transcribed using random primers following the protocol recommended by the reverse-transcriptase manufacturer (SuperScriptII, Invitrogen). Semi-quantitative PCR was then performed using specific primers, setting the cDNA dilution in RNase-free water (1 vol. RT/300 vol. H₂O) for the PCR reaction, so that the amplification is in the linear range for 30 cycles of amplification (Fig. S2). GoTaq Flexi kit (Promega) and [5μM] primers. PCR were carried out as followed: 95°C for 2min; followed by 30 cycles of 3 steps: 95°C for 30s, 60°C for 30s, 72°C for 1min; and finally 72°C for 5min. PCR products were analyzed after 2% agarose/TBE gels electrophoresis, scanned on a Typhoon Trio (GE Healthcare Life Sciences), and quantified using ImageJ software. Furthermore, we tested that RT-PCR on alternate fractions of the gradients yielded the same pattern of mRNA repartition along the gradient as RT-sqPCR on each fraction (Fig. S2), allowing a rapid screening of different conditions without losing fine

separation of polysome fractions. We analyzed the repartition of selected mRNAs along the gradient, in unfertilized and in fertilized eggs. In unfertilized eggs, the majority of the mRNAs encoding for Cyclin A, Cyclin B and R2 were on the top of the gradient, suggesting that these mRNAs were not associated to polysomes at this stage (Fig. 5). Fertilization induced a change of repartition of these mRNAs along the gradient: they were associated to polysomes fractions once the egg was fertilized. In contrast, eIF4A mRNA polysome repartition was not modified by fertilization, suggesting that this particular mRNA was not recruited into polysomes (Fig. 5). Therefore, we studied the repartition of mRNAs previously identified as recruited at fertilization, after *in vitro* or *in vivo* puromycin treatment. Puromycin added *in vivo* dissociates more efficiently active polysomes (Fig. S3). The mRNAs after puromycin treatment concentrated in the middle of the polysome gradient (as observed by others, *i.e.* (12)), corresponding to monosome fractions (Fig. 5), indicating that the mRNAs were associated to active translating polysomes.

The RNAs purified using the magnetic beads purification technique (KingFisher) were also analyzed by RT-PCR for Cyclin B mRNA repartition along the polysome gradient, and showed an identical repartition on the polysome gradient (Fig. S5) compared to the classical purification protocol (Fig. 4). This result validates the use of this purification technique for polysome gradients and should ease the large-scale preparation of polysomal RNAs for sequencing projects.

Altogether, these results show that Cyclin A, Cyclin B and R2 mRNAs are recruited into active polysomes, while eIF4A mRNA remains untranslated following fertilization of sea urchin eggs. Collectively, these data demonstrate for the first time a differential behavior of polysomal recruitment of specific mRNAs at fertilization.

4. Conclusion and perspectives

There is currently a large expansion of new organisms studied, spanning all phyla of life, with large sets of genomic and transcriptomic data associated. While mRNA transcription is widely studied as the cornerstone of gene expression, the mere presence of an mRNA is not a guaranty that the protein it encodes for is translated. Polysome profiling has been proven powerful to address the translational status of an mRNA, at a specific time, in response to biological changes, such as development or adaptation to environment. This technique is often described as time-consuming and delicate to implement. Thanks to technical adaptation for parallel processing of polysome samples, polysome profiling will bring new insights into large-scale analysis of translation regulation and in general translational control, in classical

or emerging model organisms. The protocol presented here recapitulates the critical steps of the polysome profiling techniques, showing its successful application to a marine model. We believe that this protocol will help investigators to apprehend this aspect of regulation in the comprehensive study of their model organism, both in term of molecular mechanisms and on comparative evolution.

Acknowledgments

We thank T. Lepage and P. Dru for granting access to the *P. lividus* transcriptome at (<http://octopus.obs-vlfr.fr/>). We thank the SMO and M3 services of the Station Biologique for collection and maintenance of sea urchins. This work is supported by research grants from La Ligue contre le Cancer (coordination du Grand Ouest (comités Finistère, Côtes d'Armor, Deux-Sèvres, Morbihan), the Région Bretagne, the Conseil Général du Finistère; by ITMO AVIESAN CNRS/INSERM for equipment grant.

References

1. Jackson,R.J., Hellen,C.U.T. and Pestova,T. V (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 113–27.
2. Hershey,J.W.B., Sonenberg,N. and Mathews,M.B. (2012) Principles of Translational Control: An Overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, a011528–a011528.
3. Schwanhäusser,B., Busse,D., Li,N., Dittmar,G., Schuchhardt,J., Wolf,J., Chen,W. and Selbach,M. (2011) Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, **473**, 337–42.
4. Wang,T., Cui,Y., Jin,J., Guo,J., Wang,G., Yin,X., He,Q.-Y. and Zhang,G. (2013) Translating mRNAs strongly correlate to proteins in a multivariate manner and their translation ratios are phenotype specific. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 4743–54.
5. Vogel,C. and Marcotte,E.M. (2012) Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.*, **13**, 227–32.
6. De Sousa Abreu,R., Penalva,L.O., Marcotte,E.M. and Vogel,C. (2009) Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol. Biosyst.*, **5**, 1512–26.
7. Gawron,D., Gevaert,K. and Van Damme,P. (2014) The proteome under translational control. *Proteomics*, **14**, 2647–2662.
8. Li,G.W., Burkhardt,D., Gross,C. and Weissman,J.S. (2014) Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources. *Cell*, **157**, 624–635.
9. Ingolia,N.T., Ghaemmaghami,S., Newman,J.R.S. and Weissman,J.S. (2009) Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science*, **324**, 218–23.
10. Inada,T., Winstall,E., Tarun,S.Z., Yates,J.R., Schieltz,D. and Sachs,A.B. (2002) One-step affinity purification of the yeast ribosome and its associated proteins and mRNAs. *RNA*, **8**, 948–958.
11. King,H.A. and Gerber,A.P. (2014) Translatome profiling: methods for genome-scale analysis of mRNA translation. *Brief. Funct. Genomics*, 10.1093/bfpg/elu045.
12. Kang,Q. and Pomerening,J.R. (2012) Punctuated cyclin synthesis drives early embryonic cell cycle oscillations. *Mol. Biol. Cell*, **23**, 284–96.
13. Del Prete,M.J., Vernal,R., Dolznig,H., Müllner,E.W. and Garcia-Sanz,J. a (2007) Isolation of polysome-bound mRNA from solid tissues amenable for RT-PCR and profiling experiments. *RNA*, **13**, 414–421.
14. Chen,J., Melton,C., Suh,N., Oh,J.S., Horner,K., Xie,F., Sette,C., Blelloch,R. and Conti,M. (2011) Genome-wide analysis of translation reveals a critical role for deleted in azoospermia-like (Dazl) at the oocyte-to-zygote transition. *Genes Dev.*, **25**, 755–66.
15. Larsson,O., Tian,B. and Sonenberg,N. (2013) Toward a genome-wide landscape of translational control. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a012302.
16. Kuersten,S., Radek,A., Vogel,C. and Penalva,L.O.F. (2013) Translation regulation gets its ‘omics’ moment. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **4**, 617–30.

17. Kronja,I., Yuan,B., Eichhorn,S.W., Dzeyk,K., Krijgsveld,J., Bartel,D.P. and Orr-Weaver,T.L. (2014) Widespread Changes in the Posttranscriptional Landscape at the *Drosophila* Oocyte-to-Embryo Transition. *Cell Rep.*, **7**, 1495–1508.
18. Davidson,E.H. (1986) Utilization of maternal mRNA in development. In *Gene Activity in Early Development*. Elsevier, pp. 69–91.
19. Horner,V.L. and Wolfner,M.F. (2008) Transitioning from egg to embryo: Triggers and mechanisms of egg activation. *Dev. Dyn.*, **237**, 527–544.
20. Morales,J., Mulner-Lorillon,O., Cosson,B., Morin,E., Bellé,R., Bradham,C.A., Beane,W.S. and Cormier,P. (2006) Translational control genes in the sea urchin genome. *Dev. Biol.*, **300**, 293–307.
21. Alexandraki,D. and Ruderman,J. V (1985) Multiple polymorphic alpha- and beta-tubulin mRNAs are present in sea urchin eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 134–8.
22. Kelso-Winemiller,L., Yoon,J., Peeler,M.T. and Winkler,M.M. (1993) Sea urchin maternal mRNA classes with distinct development regulation. *Dev. Genet.*, **14**, 397–406.
23. Deprost,D., Yao,L., Sormani,R., Moreau,M., Leterreux,G., Nicolai,M., Bedu,M., Robaglia,C. and Meyer,C. (2007) The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep.*, **8**, 864–870.
24. Nemer,M. and Infante,A.A. (1967) Ribosomal ribonucleic acid of the sea urchin egg and its fate during embryogenesis. *J. Mol. Biol.*, **27**, 73–86.
25. Brandhorst,B.P. (2004) Isolating DNA, RNA, polysomes, and protein. *Methods Cell Biol.*, **74**, 579–99.
26. Pelham,H.R. and Jackson,R.J. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.*, **67**, 247–256.
27. Hogan,B. and Gross,P.R. (1971) The effect of protein synthesis inhibition on the entry of messenger RNA into the cytoplasm of sea urchin embryos. *J. Cell Biol.*, **49**, 692–701.
28. Dellacorte,C. (1994) Isolation of nucleic acids from the sea anemone *Condylactis gigantea* (Cnidaria: Anthozoa). *Tissue Cell*, **26**, 613–619.
29. Sheets,M.D., Fritz,B., Hartley,R.S. and Zhang,Y. (2010) Polyribosome analysis for investigating mRNA translation in *Xenopus* oocytes, eggs and embryos. *Methods*, **51**, 152–6.
30. Berger,S.L. and Birkenmeier,C.S. (1979) Inhibition of intractable nucleases with ribonucleoside--vanadyl complexes: isolation of messenger ribonucleic acid from resting lymphocytes. *Biochemistry*, **18**, 5143–9.
31. Morrison,M.R., Baskin,F. and Rosenberg,R.N. (1977) Quantitation and characterisation of poly(A)-containing messenger RNAs from mouse neuroblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **476**, 228–237.
32. Graber,T.E., Hébert-Seropian,S., Khoutorsky,A., David,A., Yewdell,J.W., Lacaille,J.-C. and Sossin,W.S. (2013) Reactivation of stalled polyribosomes in synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110**, 16205–10.

33. Azzam,M.E. and Algranati,I.D. (1973) Mechanism of puromycin action: fate of ribosomes after release of nascent protein chains from polysomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 3866–3869.
34. Blobel,G. and Sabatini,D. (1971) Dissociation of mammalian polyribosomes into subunits by puromycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **68**, 390–394.
35. Mamane,Y., Petroulakis,E., Martineau,Y., Sato,T.-A., Larsson,O., Rajasekhar,V.K. and Sonenberg,N. (2007) Epigenetic Activation of a Subset of mRNAs by eIF4E Explains Its Effects on Cell Proliferation. *PLoS One*, **2**, e242.
36. Potireddy,S., Midic,U., Liang,C.-G., Obradovic,Z. and Latham,K.E. (2010) Positive and negative cis-regulatory elements directing postfertilization maternal mRNA translational control in mouse embryos. *AJP Cell Physiol.*, **299**, C818–C827.
37. Rosenthal,E.T., Hunt,T. and Ruderman,J. V (1980) Selective translation of mRNA controls the pattern of protein synthesis during early development of the surf clam, *Spisula solidissima*. *Cell*, **20**, 487–494.
38. Evans,T., Rosenthal,E.T., Youngblom,J., Distel,D. and Hunt,T. (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, **33**, 389–96.
39. Kelso-Winemiller,L.C. and Winkler,M.M. (1991) ‘Unmasking’ of stored maternal mRNAs and the activation of protein synthesis at fertilization in sea urchins. *Development*, **111**, 623–33.
40. Alexandraki,D. and Ruderman,J. V. (1985) Expression of α - and β -tubulin genes during development of sea urchin embryos. *Dev. Biol.*, **109**, 436–451.
41. Standart,N.M., Bray,S.J., George,E.L., Hunt,T. and Ruderman,J. V (1985) The small subunit of ribonucleotide reductase is encoded by one of the most abundant translationally regulated maternal RNAs in clam and sea urchin eggs. *J. Cell Biol.*, **100**, 1968–76.
42. Cameron,R.A., Samanta,M., Yuan,A., He,D. and Davidson,E. (2009) SpBase: The sea urchin genome database and web site. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 750–754.

Figure legends

Fig. 1: Overview of polysome profiling protocol to analyze translation activity. The different steps of the protocol involve (1) cell lysis, (2) sucrose gradient centrifugation and (3) fractionation, (4) RNA extraction and RNA integrity check, (5) analysis of translational status of mRNAs. See the text for details.

Fig. 2: RNA quality after different conditions of sea urchin eggs lysis. Lysis was done using a 25G needle (A-E) or a Dounce homogenizer (F-J). Lysis was done from frozen eggs (A) or fresh eggs (B-J): The volume of eggs were lysed in increased volumes of lysis ranging from 2:1 to 1:4 (B-E) 1:4 is the ratio used on lanes F to J. Eggs were washed before lysis with filtered sea water FSW (G) or Ca^{2+} -free SW (H). Lysis buffer contained either 1mM EDTA (F) or 25mM EGTA (I-J). The difference between I and J is the mRNA quantity loaded (250ng/ μl and 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) on the gel, with no loss of quality. RNAs from each lysate is obtained after an acidic phenol-chloroform extraction, and separated on a TBE/ 2% agarose gel electrophoresis to check for integrity.

Fig. 3: Polysome gradient profile changes during early development. Optical density profiles (OD_{A254}) of polysome gradient profiles are shown, corresponding to unfertilized eggs (A), 1hour post-fertilization embryos (B) and late-blastula stage embryos 30 hours post-fertilization (C). The areas under the curve (AUC) of polysomes and monosomes were measured, and the polysomes/monosomes ratio was then calculated for the three developmental stages, error bars represent SEM and statistics were done using Student t-test (D).

Fig. 4: Polysome gradient profiles and corresponding RNA profiles function of the polysomes disrupter. Optical density profiles and extracted RNAs from polysome gradients of fertilized eggs (A), treated with EDTA (B), 2mM *in vitro* puromycin (C) and 0,6 mM *in vivo* puromycin (D) are shown. The RNAs from each fractions of polysome gradient are separated on TBE/ 2% agarose gel.

Fig. 5: mRNAs coding Cyclin A, Cyclin B and the small subunit of the Ribonucleotide reductase (R2) are actively translated, whereas eIF4A mRNA is not translated after fertilization in sea urchin. mRNAs were detected by RT-PCR amplification in each fraction of the polysome gradient from unfertilized eggs (UnF), 1-hour post-fertilization embryos (F) or embryos in presence of *in vivo* puromycin (F+puro *in vivo*). Amplicons

were run on agarose gels, quantified using Image J software, repartition is shown along the gradient as a percentage of total mRNA. Fraction #1 corresponds to the top of the gradient (free mRNAs) and #21 corresponds to the bottom of the gradient. Figure. 4 is a representative result of six independent experiments.

Legends to supplementary figures

Fig. S1: Polysomal RNAs purified using the described method had been used for RNA-Seq. (A) RNA gel profile. (B) Bioanalyzer results. (C) cDNA libraries.

Fig. S2: Primers information. Summary table of the primers used in this paper (*i.e.* Cyclin A, Cyclin B, R2 and eIF4A in *P. lividus* species).

Fig. S3: Cyclin B mRNA repartition along the polysome gradient in fertilized eggs is comparable when analyzing each gradient fraction or every other fraction. (A) agarose gel migration of RT-PCR amplified CycB fragments. (B) Comparison of the repartition when all the fractions (dotted line) or only odd fractions (full line) are reverse transcribed. Fraction #1 corresponds to the top of the gradients and #21 corresponds to the bottom of the gradients. Left axis corresponds to quantification of odd fractions; right axis to all fractions.

Fig. S4: Puromycin disrupts the association of Cyclin B mRNA to polysomes. (A) RT-PCR using CycB primers on gradient fractions, and corresponding agarose gel migration for fertilized embryos, treated with *in vitro* or *in vivo* puromycin. (B) Quantification of PCR- amplified fragments and repartition along the polysome gradient for the three conditions. Fraction #1 corresponds to the top of the gradients and #21 corresponds to the bottom of the gradients.

Fig. S5: Translation analysis of Cyclin B mRNAs using automated purified RNAs from polysome gradients. (A) Agarose gel electrophoresis of RNAs fractions of polysome gradients from unfertilized eggs (UnF) and 1-hour post-fertilization embryos (F). (B) cyclin B mRNA was amplified by RT-PCR in each fraction and quantified. Repartition is shown along the gradient as in Figure. 4. Figure. S5 is representative of three independent experiments.

Figures

Figure. 1

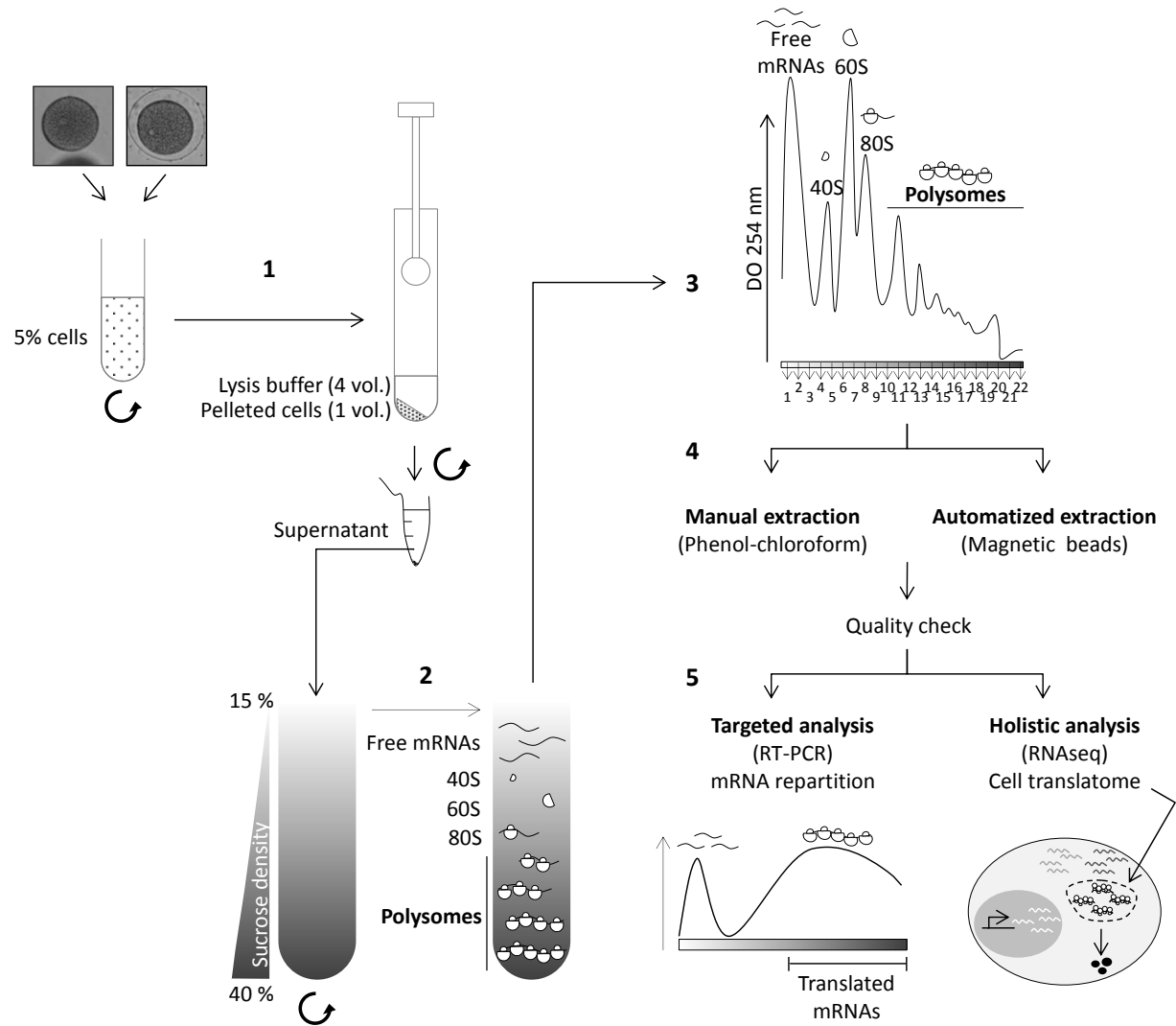


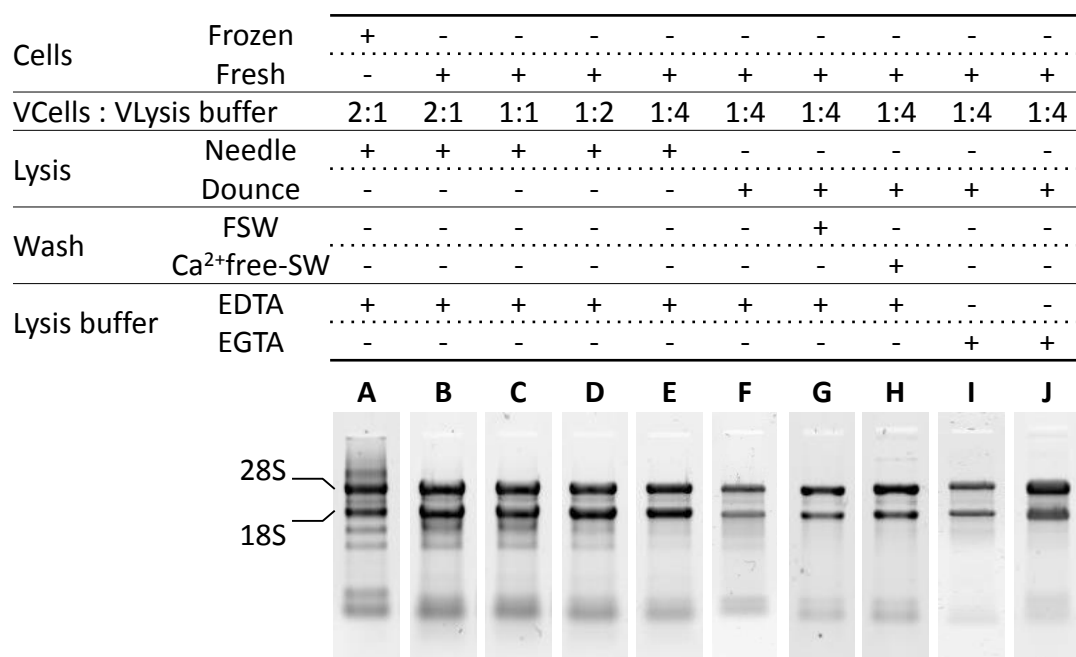
Figure. 2

Figure. 3

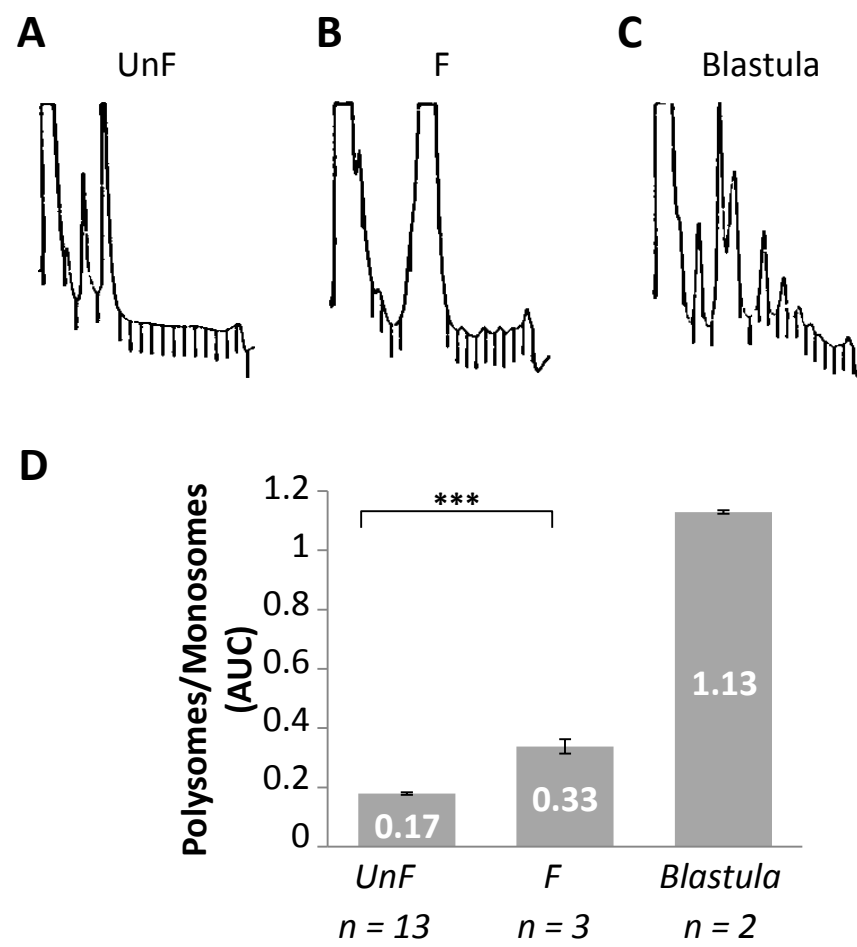


Figure. 4

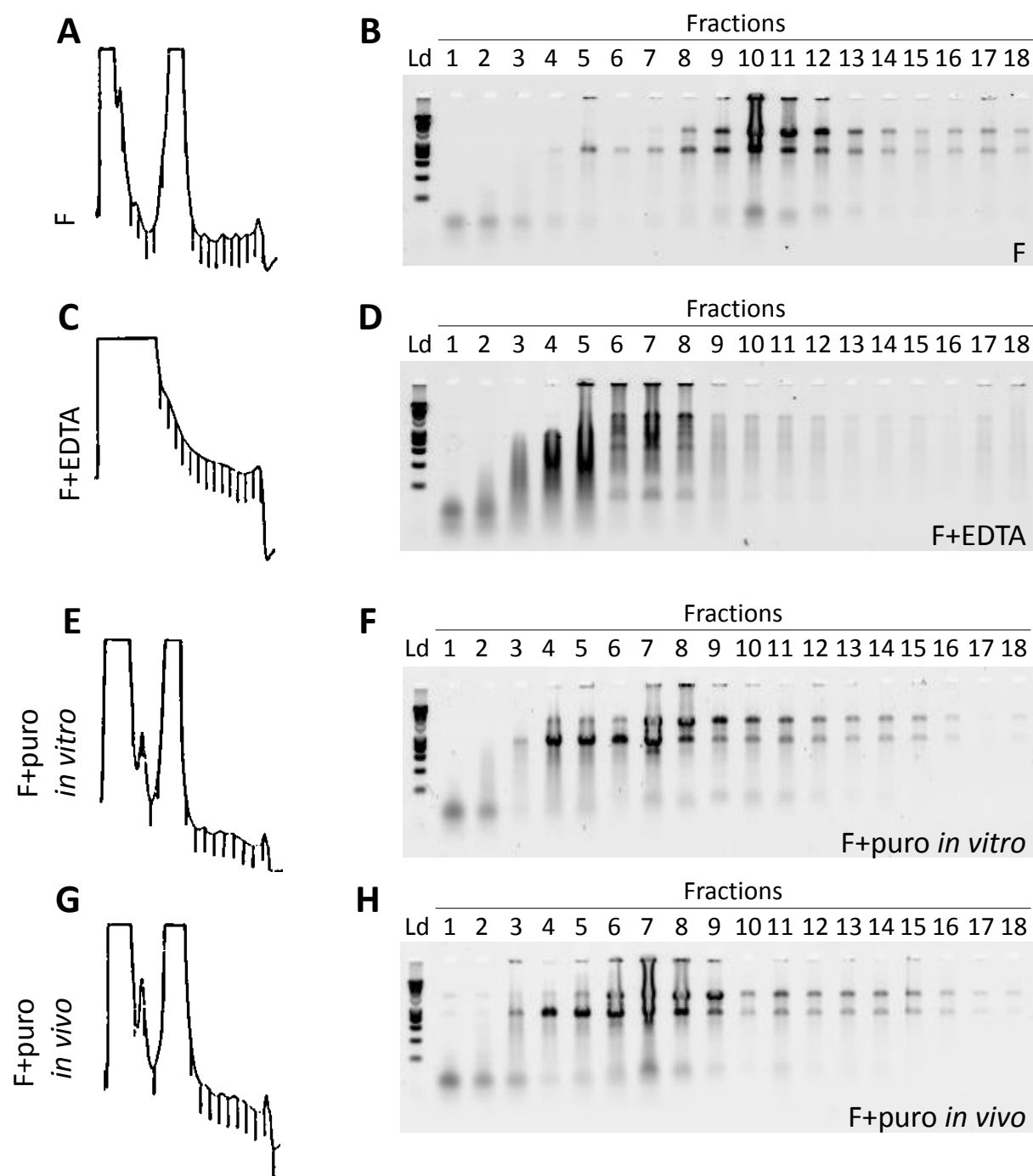
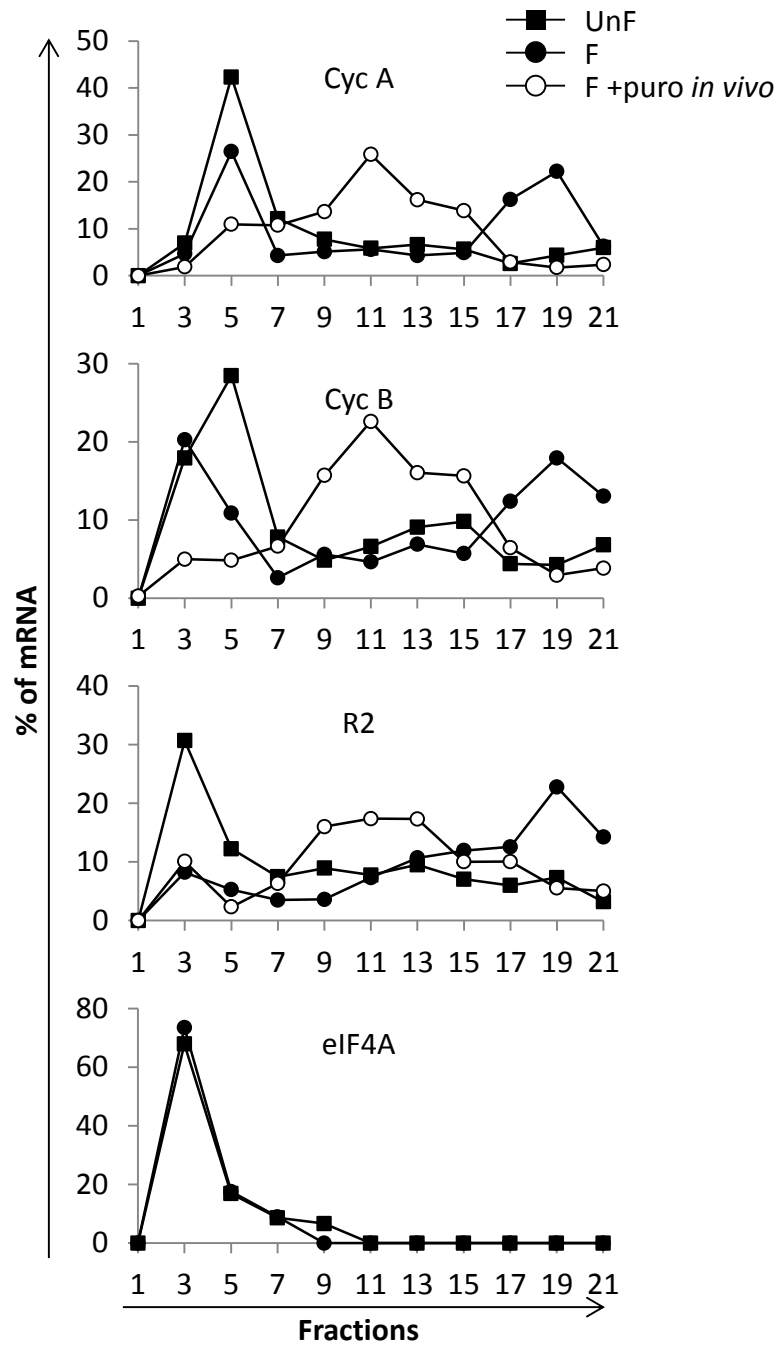


Figure. 5



Supplementary Figures

Figure. S1

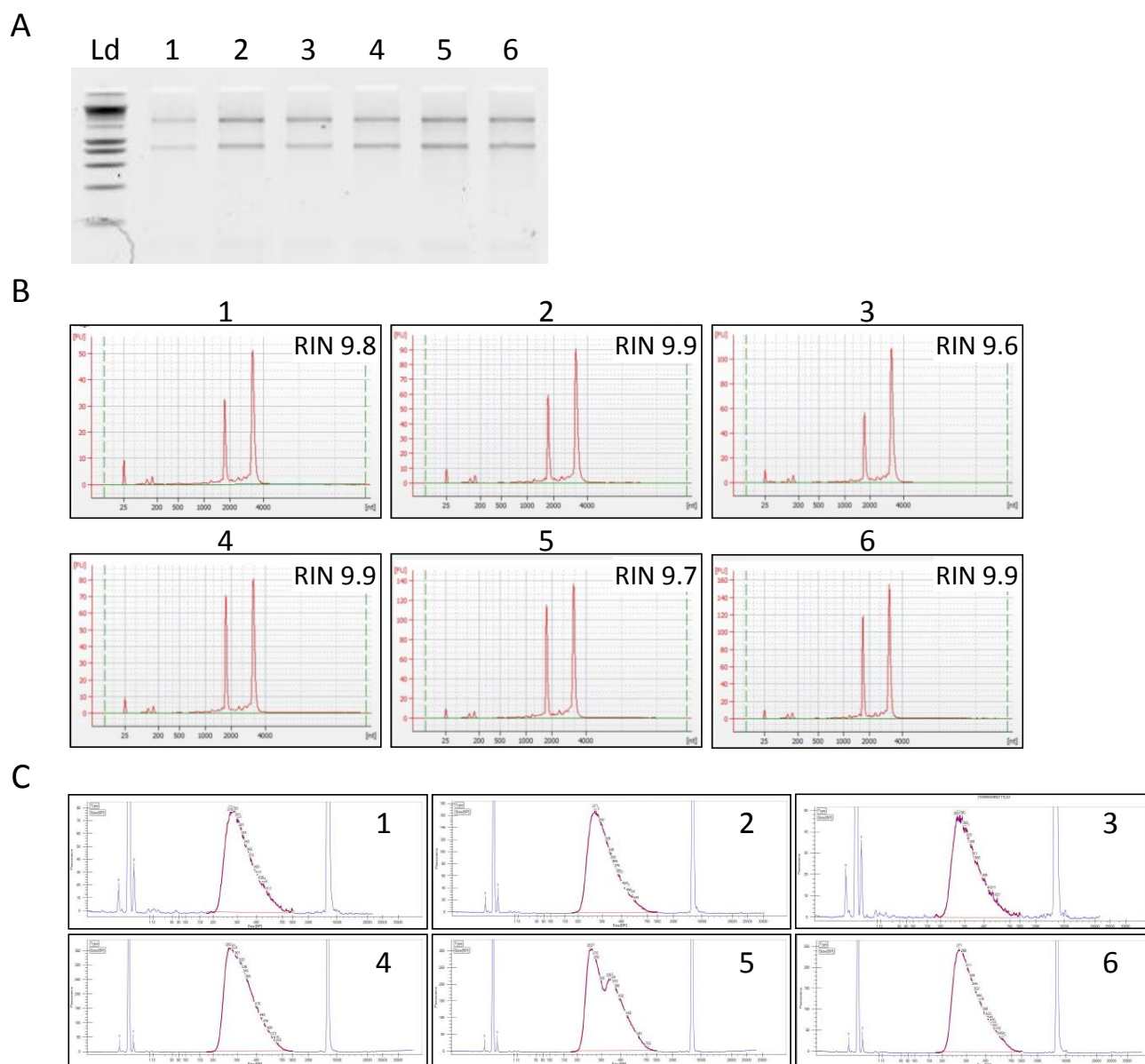


Figure. S2

Gene	Primers	Sequences	Product lenght	R ²
Cyclin A	Cyc A	CCAACCATGGCCCACTATAC ACCCCATCTCCCATCCTTAC	243 bp	0.970
Cyclin B	Cyc B	CAAAGAGCATGGCTGTTCAA CCATTGTATCCATCGCCTCT	234 bp	0.986
RNR small subunit	R2	TTCGCTGCCAGTGATGGA TCGGCAACCTGGACTTCCT	70 bp	0.989
eIF4A	eIF4A	TGGTCAAGAAGGAAGAAC CGTCTCATACAAGTCACA	103 bp	0.990

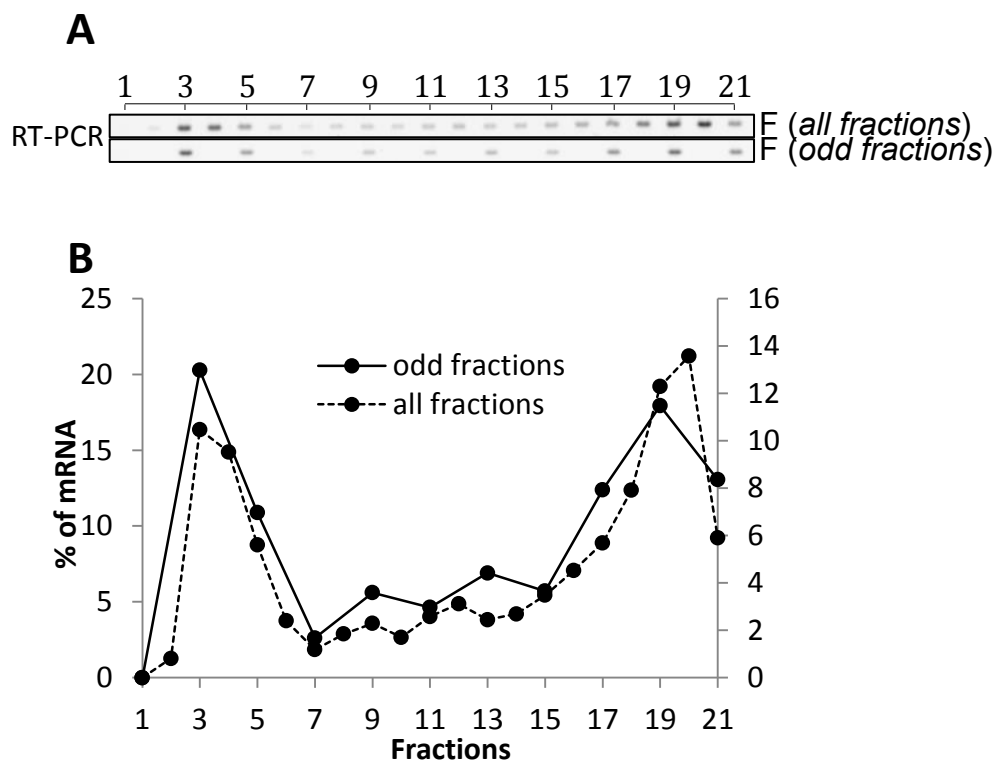
Figure. S3

Figure. S4

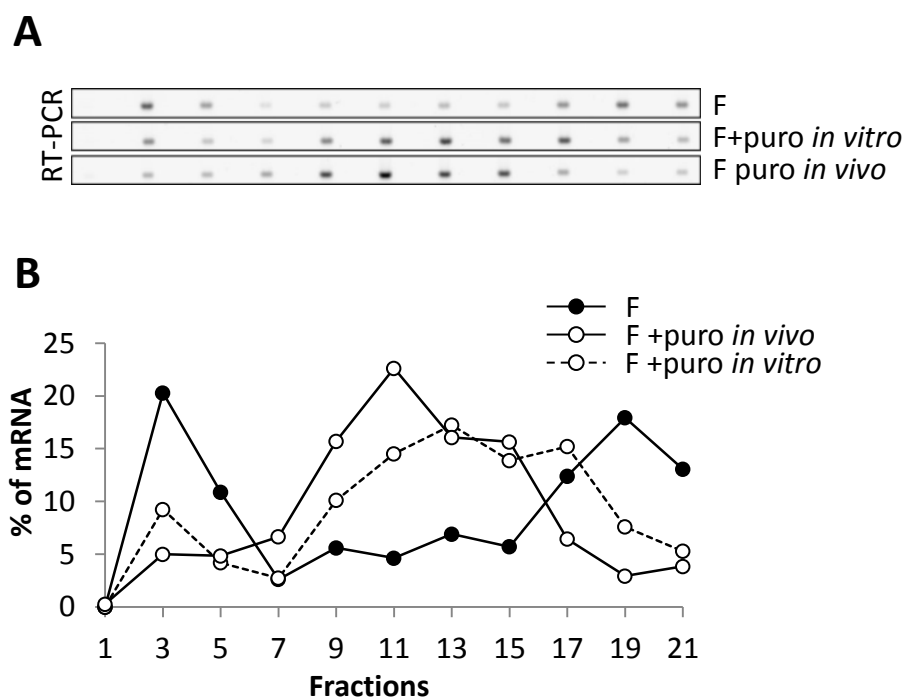
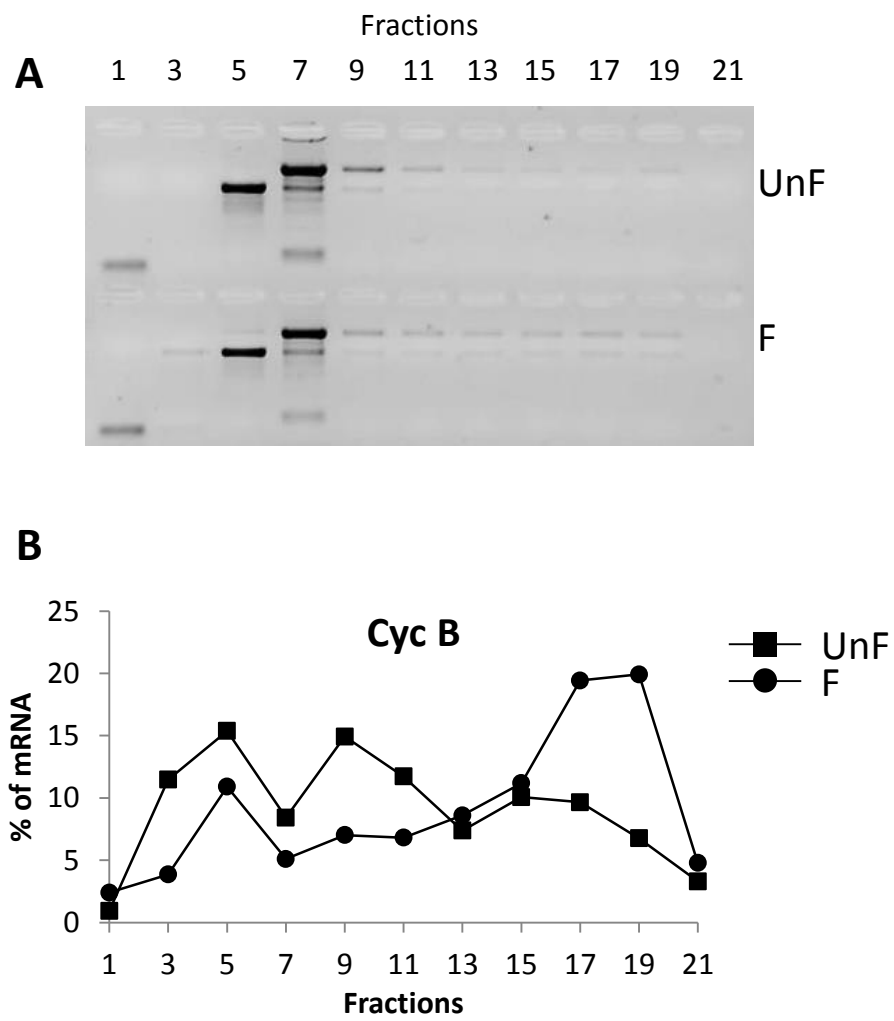


Figure. S5



2. Article 2

« Cyclin B mRNA recruitment into polysomes at sea urchin fertilization depends on mTOR activity »

Chassé, H.*, Mulner-Lorillon, O.*, Boulben, S., Glippa, V., Morales, J., Cormier, P. (2015)

Soumis à Dev. Biol

L'entrée en mitose est contrôlée par le complexe CDK1/Cycline B. CDK1 est la sous-unité catalytique du complexe, et Cycline B la sous-unité régulatrice. Dans l'embryon précoce d'oursin, la protéine CDK1 est maternellement présente et fortement abondante. En revanche, avant la fécondation, la synthèse de Cycline B n'a pas lieu car l'initiation de la traduction est bloquée, notamment par la séquestration d'eIF4E par la protéine inhibitrice 4E-BP. La fécondation provoque une activation de la voie mTOR, responsable de la dissociation eIF4E-4E-BP et de la dégradation de 4E-BP. La libération d'eIF4E active la machinerie traductionnelle et permet le recrutement polysomal du transcrit de la Cycline B. Cette néotraduction provoque l'accumulation de la protéine Cycline B, ce qui est nécessaire à la reprise du cycle cellulaire.

Dans cet article, nous nous sommes intéressés à la régulation traductionnelle de l'ARNm de la Cycline B à la fécondation, chez deux espèces d'oursins, séparés évolutivement de 20Ma. Nous avons mis en évidence que l'inhibition de la voie mTOR par le PP242 inhibe le recrutement polysomal du messenger de la Cycline B, ce qui retarde fortement l'accumulation de la protéine, l'activation du complexe CDK1/Cycline B, et par conséquent l'entrée en mitose. Il s'agit de la première démonstration du rôle de la voie mTOR sur la traduction de la Cycline B.

De manière très intéressante, l'inhibition du recrutement polysomal du transcrit de Cycline B par le PP242 est partielle. Il existe une petite quantité de messagers qui continue d'être activement traduite dans les polysomes, malgré l'inhibition de la voie mTOR. Ce résultat suggère que la traduction de la Cycline B fasse intervenir deux mécanismes de

régulation distincts, l'un dépendant de l'activité de la voie mTOR, et l'autre indépendant de cette activité (**Figure. 31**). La double régulation de la traduction de la Cycline B révèle la complexité et l'orchestration très fine du contrôle du cycle cellulaire qui se met en place à la fécondation.

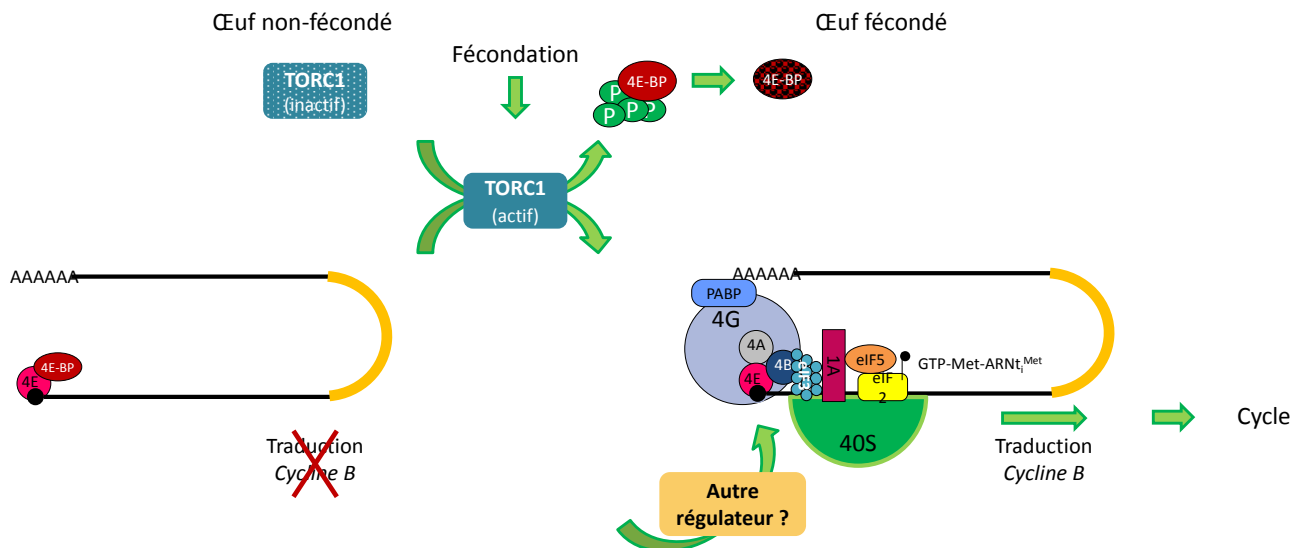


Figure 31 : Régulation de la traduction de la Cycline B dans l'embryon d'oursin. Avant la fécondation, l'initiation de la traduction est bloquée, il n'y a donc pas de néosynthèse de Cycline B. La fécondation provoque l'activation de la voie mTOR qui hyperphosphoryle 4E-BP qui est ensuite dégradé. La machinerie traductionnelle est activée et la traduction de Cycline B commence. La régulation de la traduction de la Cycline B fait intervenir un deuxième mécanisme, indépendant de la voie mTOR, qui reste à déterminer.

Cyclin B mRNA recruitment into polysomes at sea urchin fertilization depends on mTOR activity

Chassé Héloïse^{1,2*}, Mulner-Lorillon Odile^{1,2*}, Boulben Sandrine^{1,2}, Glippa Virginie^{1,2}, Morales Julia^{1,2‡‡}, Cormier Patrick^{1,2‡‡}

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 8227, Laboratory of Integrative Biology of Marine Models, Team Translation Cell Cycle and Development, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, F-29688, Roscoff cedex, France.

² CNRS, UMR 8227, Laboratory of Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, F-29688, Roscoff cedex, France.

*these authors contributed equally to this work.

‡‡Authors for correspondence: (cormier@sb-roscoff.fr; morales@sb-roscoff.fr; mulner@sb-roscoff.fr)

Running title: PP242-inhibition of Cyclin B translation in sea urchin

Abstract

The Cyclin B-CDK1 complex is a key regulator of mitotic entry. Using PP242, a specific ATP-competitive inhibitor of mTOR kinase, we provide evidence that mTOR signalling pathway controls Cyclin B mRNA translation following fertilization in *Sphaerechinus granularis* and *Paracentrotus lividus*, two sea urchins species separated by 20 million years evolution. We show that PP242 inhibits the degradation of the cap dependent translation 4E-BP (eukaryotic initiation factor 4E-Binding Protein). PP242 inhibits global protein synthesis, delays Cyclin B accumulation, Cyclin B-CDK1 complex activation and consequently entry into the mitotic phase of the cell cycle triggered by fertilization. PP242 inhibits Cyclin B mRNA recruitment into active polysomes triggered by fertilization. An amount of Cyclin B mRNA present in active polysomes is insensitive to PP242 treatment. These results show that, following sea urchin egg fertilization, Cyclin B mRNA translation is controlled by two independent mechanisms: a PP242-sensitive and an additional pp242-insensitive mechanism.

Key words: sea urchin fertilization, PP242, 4E-BP, mTOR, Cyclin B, cell cycle, translation

Introduction

Cyclins and their catalytic kinase partners CDKs (Cyclin-Dependent Kinases) control cell-cycle progression (Malumbres, 2014). The mitotic Cyclins A and B were first discovered in sea urchin as key proteins, which are synthesized and degraded during M-phase at each cell division (Evans et al., 1983). Different mechanisms that underlie the control of mitotic Cyclin B translation during the cell cycle and development transitions of model organisms have been reported (Kronja and Orr-Weaver, 2011). In sea urchin and clams, Cyclin B is synthesized continuously and rapidly destroyed shortly before the metaphase-anaphase transition of the mitotic cell cycles (Evans et al., 1983). In *Xenopus*, Cyclin B translation was reported to be maximal during mitosis and to be driven by the polyadenylation of Cyclin B mRNA in cycling extracts from embryos (Groisman et al., 2002). CDK1-mediated negative feedback loop was shown to decrease Cyclin B translation and drive *Xenopus* early embryonic cell cycle oscillations (Kang and Pomerening, 2012). Taken together, these studies highlight the requirement for fine-tuning of mitotic cyclins translation during the cell cycle (Le Breton et al., 2005).

The early steps of the first mitotic division induced by fertilization of sea urchin eggs represent an optimal system for studying the relationships between mRNA translation regulation and mitotic cell cycle for the following reasons. Sea urchin eggs have completed their meiotic maturation and are haploid cells blocked in G1. The overall rate of protein synthesis is low in unfertilized eggs and fertilization triggers a dramatic rise in protein synthesis independently of mRNA transcription (Epel, 1967). Sea urchin embryos are naturally synchronized during the first mitotic divisions. *De novo* protein synthesis is dispensable for S-phase progression but is required for the onset and normal progression of mitosis (Wagenaar, 1983). A comparative genomics platform for the echinoderm clade is available (<http://Echinobase.org>) (Cameron et al., 2009). The *S. purpuratus* genome analysis allowed identifying the canonical B-type cyclin (Fernandez-Guerra et al., 2006; Sea Urchin Genome Sequencing et al., 2006). Cap-dependent translation is highly regulated following fertilization and is involved in the onset of the first mitotic division of the sea urchin embryos (Cormier et al., 2001; Jagus et al., 1992; Lopo et al., 1989).

The mechanism of eukaryotic cap-dependent initiation of translation accounts for the translation of most eukaryotic mRNAs (Hernandez, 2009). Eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E), a central actor for the control cap-dependent translation initiation, is a cap-binding protein that binds to m⁷GpppN (where N is any nucleotide) present at the 5' extremity of the

vast majority of eukaryotic mRNAs (reviewed in (Topisirovic et al., 2011)). eIF4E bridges the mRNA and the ribosome (Gingras et al., 1999) by recruiting eukaryotic Initiation Factor 4G (eIF4G), a scaffolding protein that acts as docking site for several proteins including Initiation Factors 3 (eIF3) and 4A (eIF4A). eIF4G also associates with the poly(A)-binding protein (PABP) that interacts with poly(A) tail. This association stimulates translation of polyadenylated mRNAs (Kahvejian et al., 2005).

eIF4E-Binding Proteins (4E-BPs) are well-characterized inhibitors of eIF4E function (reviewed in (Martineau et al., 2013)). Three 4E-BPs (4E-BP1, 4E-BP2 and 4E-BP3) exist in mammals (Pause et al., 1994; Poulin et al., 1998; Rousseau et al., 1996). A single 4E-BP ortholog exists in sea urchin (Morales et al., 2006). 4E-BPs competitively inhibit eIF4G association with eIF4E. Binding of 4E-BPs to eIF4E is regulated by phosphorylation (Bah et al., 2014; Lin et al., 1994). Hypophosphorylated 4E-BP binds to eIF4E and inhibits cap-dependent translation, whereas hyperphosphorylated forms do not.

4E-BPs phosphorylation is controlled *via* the mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin) pathway (reviewed in (Fonseca et al., 2014; Laplante and Sabatini, 2012)). mTOR is an atypical serine/threonine protein kinase that interacts with several proteins to form two distinct complexes named mTOR complex 1 (TORC1) and 2 (TORC2), which are evolutionarily conserved from yeast to mammals (Loewith et al., 2002). Translational regulation is the best-characterized process regulated by TORC1, which phosphorylates p70 S6 kinase and 4E-BP1, which in turn, promote protein synthesis (reviewed in (Ma and Blenis, 2009)). TORC2 controls the actin cytoskeleton (Jacinto et al., 2004). TORC1 is sensitive to rapamycin but not TORC2 (Loewith et al., 2002).

We previously showed in the sea urchin *Spharechinus granularis* that 4E-BP degradation triggered by fertilization allows eIF4E association with eIF4G and the consequent accumulation of Cyclin B (Oulhen et al., 2007; Salaun et al., 2003). 4E-BP degradation induced by fertilization of sea urchin eggs is affected by rapamycin treatment, suggesting that it reflects TORC1 signaling (Salaun et al., 2003). Rapamycin does not directly inhibit TOR kinase activity (Guertin and Sabatini, 2009). In mammal cells, rapamycin associates with FKBP12 (12-kDa FK506 Binding Protein) and together they affect TOR's enzymatic activities by binding to a domain different from mTOR kinase site.

PP242 is a novel and specific ATP-competitive inhibitor of mTOR kinase (Feldman et al., 2009). PP242 is a dual inhibitor of TORC1 and TORC2 and it inhibits more efficiently TORC1 than rapamycin. Here, using PP242, we set out to study mTOR signaling in the control of mitotic Cyclin B translation following egg fertilization in *S. granularis* and *P.*

lividus, two sea urchin species separated by 20 million years evolution (Cameron et al., 2009; Smith et al., 2006). We show that PP242 inhibits drastically 4E-BP degradation and delays Cyclin B accumulation triggered by fertilization. PP242 delays consequently activation and mitotic cell division triggered by fertilization. We demonstrate that Cyclin B mRNA recruitment into active polysomes induced by fertilization is controlled by two independent mechanisms: a PP242-sensitive and an additional PP242-insensitive mechanism.

Materials and Methods

Chemicals

Sodium orthovanadate, EDTA, EGTA, dithiothreitol (DTT), N -2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (Hepes), sodium fluoride, p-nitrophenyl phosphate, leupeptin, aprotinin, soybean trypsin inhibitor, benzamidine, ATP, Tween 20, and Triton X-100 were obtained from Sigma-Aldrich.

The mTOR inhibitor, PP242 was purchased from Sigma-Aldrich (France). [³⁵S]L-methionine, was purchased from Perkin-Elmer (France). Rabbit polyclonal antibodies directed against *S. granularis* Cyclin B (Lozano et al., 1998) were a generous gift from Professor Gérard Peaucellier (Banyuls, France). Rabbit polyclonal antibodies directed against *S. granularis* 4E-BP were previously described (Oulhen et al., 2010). Mouse monoclonal antibody directed against human PSTAIR (P7962) was purchased from Sigma-Aldrich (France). Rabbit monoclonal antibody directed against human Phospho³²⁰T-PP1Cα (ab62334) (Lewis et al., 2013) was obtained from Abcam. Mouse monoclonal antibody directed against rabbit eIF4E was purchased from Transduction Laboratories (Lexington, KY). Peroxydase-conjugated secondary antibodies were obtained from Dako SA. Amersham ECL Western blotting detection reagents were from GE Healthcare and ECL2 western blotting substrate was from Pierce.

Handling of gametes and embryos

Sphaerechinus granularis and *Paracentrotus lividus* collected in the Brest area (France) were obtained from CRBM (Centre de Ressources Biologiques Marines) at the Roscoff Biological Station (France). Spawning of gametes was induced by intracoelomic injection of 0.1M acetylcholine. Eggs were collected in 0.22μm Millipore-filtered seawater (FSW) and rinsed twice by centrifugation (2,000rpm, 2min). Eggs were dejellied by swirling twenty seconds in 3.5mM citric acid, pH5 and rinsed three times with fresh FSW. For fertilization, eggs were suspended in FSW (5% suspension). Diluted sperm was added to the eggs. Experiments were only performed on batches exhibiting greater than 90% fertilization; each experiment used gametes from a single female. Cultures were performed at 16°C under constant agitation. When required PP242 was added at the indicated final concentration to the eggs suspension 10 min before fertilization, from a 30 mM stock solution in DMSO.

Determination of cleavage rates and cytological analysis

At time intervals during 4 hours after fertilization, cleavage was scored by observation under a phase contrast microscope. Thousands of embryos were incubated for each experimental determination, from which around 100 were scored for cleavage occurrence. At various times after fertilization, 0.2ml aliquots of embryo suspension were fixed overnight in 1 ml methanol/glycerol (3 :1, v/v) in the presence of the DNA dye Hoechst (bisbenzimidazole, 0,1µg/ml), mounted in 50% glycerol. The nuclear envelope and DNA were respectively observed under Nomarski differential interference contrast (DIC) and fluorescence microscopy (Zeiss, Marly Le Roi, France).

Embryo extracts and Western blot analyses

At different times following fertilization, total extracts were obtained by direct solubilization of 20µl pelleted cells (eggs or embryos) in 150µl of SDS-Fix buffer containing 2% sodium dodecyl-sulfate (SDS), 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 62.5mM Tris HCl, pH 6.8.

Proteins were resolved by SDS-PAGE. 4E-BP level was assessed after sample resolution on a gel containing 15% acrylamide/bisacrylamide from a 40% stock solution (acrylamide/bisacrylamide; 2.6%), and Phospho³²⁰T-PP1Cα and Cyclin B analysis were performed on a 12% acrylamide gel containing 0.1% bisacrylamide.

Western blot analyses were performed following electrophoretic transfer of proteins from SDS-PAGE onto 0.22µm nitrocellulose membranes (Towbin et al., 1979). Membranes were incubated with antibodies against Cyclin B (1:1000), 4E-BP (1:5000), Phospho³²⁰T-PP1Cα (1:1000), PSTAIR (1:1000), eIF4E (1:2000). The antigen-antibody complex was measured by chemiluminescence using horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies according to the manufacturer's instructions (ECL or ECL2). Signals were quantified using the public domain NIH Image program (written by Wayne Rasband at the US National Institutes of Health).

Analysis of Cyclin B/CDK1 complex activity in vivo

The activation state of Cyclin B/CDK1 complex was determined by monitoring the endogenous T³²⁰-phosphorylation status of PP1Cα, the catalytic subunit of protein phosphatase1 shown to be a natural substrate for CDK1 (Lewis et al., 2013). Measurements

were done by western blotting after electrophoretic resolution of total protein extracts from embryos taken at indicated times after fertilization.

Protein synthesis in vivo

A batch of unfertilized eggs (5% suspension in FSW) was incubated for 1h in 10 μ Ci/ml [³⁵S]-L-methionine at 16°C. Eggs were then rinsed in FSW and fertilized in the presence or absence of 10 μ M PP242. At the indicated times, 200 μ l of cell suspension was pelleted and frozen in liquid nitrogen. Cell extracts were prepared by re-suspending the pellets in 400 μ l ice-cold buffer (40mM HEPES, pH7.6, 100mM NaCl, 0.4mM EDTA, 2mM dithiothreitol (DTT), 0.2mM Sodium orthovanadate, 20mM *p*-nitrophenyl phosphate, 100mM sodium fluoride, 100mM β -glycerophosphate, and 10 μ g/ml Protease Inhibitor Cocktail (P2714, Sigma-Aldrich). [³⁵S]-methionine incorporation was measured on duplicate aliquots after 10% TCA precipitation on Whatman 3M filters and counting in the presence of Optiphase Supermix scintillation liquid. Radioactive proteins were visualized after resolution on 12% acrylamide SDS-PAGE followed by autoradiography of the gels on Kodak Biomax MR films.

Polysomal RNA preparation, RNA extraction and RT-PCR analysis

At the indicated times, 5ml of 5% cell suspension was pelleted. 1vol. of pelleted cells was lysed with a Dounce homogenizer in 1vol. of polysome lysis buffer in RNase-free water (10mM Tris, pH 7.4; 250mM KCl; 10mM MgCl₂; 25mM EGTA; 0.4% Igepal; 5% sucrose; 1mM DTT; 10 μ g/ml Aprotinin; 2 μ g/ml Leupeptin; 100 μ g/ml Emetin; 40U RNase inhibitor). Lysates are then clarified for 10min at 13,000rpm. Supernatants were loaded on a linear 15-40% sucrose gradient (10mM Tris, pH 7.4; 250mM KCl; 10mM MgCl₂; 25mM EGTA; 1mM DTT), which ran for 2.5h at 38,000rpm in a SW41Ti rotor at 4°C. Gradients were fractionated into equal fractions (~600 μ l per fraction). RNAs were extracted with the KingFisher Pure RNA tissue kit (ThermoFisher), each fraction was diluted with one volume lysis buffer provided in the kit and processed using manufacturer's instruction. RNA integrity was checked on 2% agarose/TBE gel electrophoresis. Equal volume of RNA isolated from each fraction was used for cDNA synthesis using the reverse transcriptase SuperScriptII (Invitrogen) according to manufacturer's instruction. cDNAs were diluted in RNase-free water (1vol. RT/300vol. H₂O). Amplicon amplifications were done using the GoTaq Flexi kit (Promega) and [5 μ M] primers. Primers designed from *S. granularis* Cyclin B sequence

(Y08016): F (5'-GCCAGCAAGTATGAAGAG-3') and R (5'-AACCTCCATCTGTCTGAT-3') or *P. lividus* Cyclin B sequence (<http://Echinobase.org>): F (5'-CAAAGAGCATGGCTGTTCAA-3) and R (5'-CCATTGTATCCATCGCCTCT-3') were used at 0.6µM final concentration. PCR were carried out as followed: 95°C for 2min; followed by 30 cycles of 3 steps: 95°C for 30s, 60°C for 30s, 72°C for 1min; and finally 72°C for 5min. PCR products were analyzed on 2% agarose/TBE gels electrophoresis and scanned on a Typhoon Trio (GE Healthcare Life Sciences). Quantification was done using the public domain NIH Image program (written by Wayne Rasband at the US National Institutes of Health).

Results

PP242 affects early embryonic development in sea urchins

The effect of PP242 was first analyzed on the kinetics of cell division following fertilization. Unfertilized *S. granularis* eggs were pre-incubated for 10min in the presence of different PP242 concentrations. They were then fertilized, cultured in drug-containing medium and scored for the first embryonic division (Fig. 1A). PP242 induced a dose-dependent delay in the occurrence of cell division as judged by the percentage of 2 cell-stage measured during 4 hours post-fertilization. At 30 μ M the drug completely prevented the resumption of cell cycle induced by fertilization. At 10 μ M PP242, it was reproducibly observed (n=8) that embryos began to divide with a delay of at least 60min compared to their untreated sibling embryos. PP242 did not affect fertilization *per se* since elevation of the fertilization membrane and the movement of the female and male pronuclei up to their fusion occurred normally (Fig. 1B). However, the nuclear envelope remained intact until at least 180min post-fertilization indicating a block at the entry into M-phase of the cell cycle.

The main well-known target of mTOR in cells is the cap-dependent protein synthesis inhibitor, 4E-BP. The effect of PP242 on 4E-BP was therefore examined (Fig. 2). As already reported (Salaun et al., 2003) fertilization induced the rapid and almost complete disappearance of 4E-BP during the first 15 minutes. Fertilization in the presence of PP242 strongly inhibited 4E-BP disappearance, the protein remaining at a constant and high level after fertilization.

Global protein synthesis activity was then compared in PP242-treated *versus* untreated embryos (Fig. 3). In control embryos, as expected, fertilization induced an increase in the level of neo-synthesized proteins measured as indicated in Material and Methods. In contrast, in PP242-treated embryos, the neo-synthesized protein amount remained low, increasing only 4 fold from unfertilized eggs at 150 min after fertilization, as compared to the 10 fold for untreated fertilized *versus* unfertilized embryos. Although global protein synthesis was reduced by PP242, no significant difference in the profile of neo-synthesized proteins was observed following PP242 treatment (Fig. 3B, compare left and right panels).

To ascertain the cell cycle stage for the PP242 effect, the *in vivo* kinetics of Cyclin B/CDK1 complex activation was monitored in treated embryos following fertilization. We took advantage of the specific phosphorylation of the alpha catalytic subunit of the serine/threonine-protein phosphatase 1 (PP1C α) at threonine 320 (in the human sequence) by Cyclin B/CDK1 (Kwon et al., 1997), and the availability and cross reactivity in sea urchin of

antibodies that distinguish phosphorylated from non-phosphorylated PP1C α threonine 320 (Lewis et al., 2013). Thus, Cyclin B/CDK1 complex activation was monitored by Western blot analysis of the phospho³²⁰T-PP1C α level in total extracts from embryos taken at different times after fertilization in the presence or not of PP242. Results from a typical experiment are reported Figure. 4. A peak of phospho³²⁰T-PP1C α reflecting Cyclin B/CDK1 activation appeared at 90 min post-fertilization in accordance with the time of the first mitosis in untreated embryos. When embryos were treated with PP242, a significant and reproducible delay in Cyclin B/CDK1 activation was observed. Among 6 independent experiments, the delay in Cyclin B/CDK1 activation was of more than 60 min correlating with the delay observed in cell division occurrence.

Considering the requirement for a critical amount of Cyclin B to induce the formation of Cyclin B/CDK1 complex (Genevriere-Garrigues et al., 1995; Voronina et al., 2003), we next addressed the dynamics of Cyclin B production in the presence of PP242 (Fig. 5). Cyclin B level was quantified in embryos by Western blotting at different times post-fertilization. As already well documented, the amount of the protein, which is low in unfertilized eggs, increased significantly from 60 min post-fertilization reaching its highest level at around 90 min, at the time of Cyclin B/CDK1 peak of activity, then decreasing abruptly to allow exit from metaphase. In PP242-treated embryos, Cyclin B level did not increase before 135 min post-fertilization, delayed by more than 60 min compared to control embryos. This delay was reproducibly observed in 6 independent experiments.

We carried out a similar set of experiments on embryos of *P. lividus*, a sea urchin species separated from *S. granularis* by 20 million years of evolutionary time. PP242 used at 10 μ M dramatically delayed the first mitotic division (Fig. 6A). Accordingly, the drug was found to affect global protein synthesis (Fig. 6B and 6C), efficiently inhibit 4E-BP degradation (Fig. 6D) and delay Cyclin B/CDK1 complex activation (Fig. 6E). Unfortunately, none of the available Cyclin B-directed antibodies were found to cross-react with this protein in *P. lividus*, making the analysis of Cyclin B protein expression after fertilization not possible (data not shown).

Altogether, these data demonstrated that, in two evolutionary distant sea urchins, a PP242-sensitive pathway is conserved and controls Cyclin B accumulation. PP242 affects the degradation pathway of 4E-BP and consequently induces the stabilization of the translational inhibitor, which maintains a low activity of protein synthesis, preventing Cyclin B accumulation and Cyclin B/CDK1 activation triggered by fertilization.

PP242 inhibits Cyclin B mRNA recruitment into polysomes following fertilization

Protein level is the result from its translation *versus* its degradation rates. Polysome analysis is widely used to evaluate changes in the translation of specific mRNAs (Faye et al., 2014; Merrick and Hensold, 2001). We recently optimized a protocol to purify polysomes on sucrose gradient from sea urchin eggs and demonstrated that Cyclin B mRNA became actively translated following fertilization (Fig. S1).

To estimate the implication of translation in the PP242 effect on Cyclin B level in embryos, we compared Cyclin B mRNA recruitment into polysomes in PP242-treated and untreated control embryos (Fig. 7). We chose to first carry out those analysis using *P. lividus* embryos, which present more synchronicity in the cell division kinetics (Fig. 7A). Polysome preparations from *P. lividus* embryos were performed at 60 min post-fertilization, corresponding to M-phase in control embryos, as judged by the occurrence of the Cyclin B/CDK1 activity peak (Fig. 6E). At that time, Cyclin B mRNA was actively recruited into the active polysomal fractions, which sediment in heavy sucrose fractions of the gradient (Fig. S1). The drug PP242 decreased the percent of Cyclin B mRNA associated to the polysomal fractions. However, a significant percent of Cyclin B mRNA remained in heavy sucrose fractions after PP242 treatment (Fig. 7A and 7C). In order to discriminate if this remaining amount of Cyclin B mRNA was present in active polysomes or in messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs), PP242-treated embryos were incubated with puromycin before polysomes preparation. Cyclin B mRNA remaining in polysomal fractions of the PP242-treated embryos shifted to lower fractions of the gradient after puromycin treatment. These data indicate that Cyclin B mRNA remaining in the heavy sucrose fractions in the PP242-treated embryos was indeed present in active polysomes.

We also performed two experiments using *S. granularis* early embryos (Fig. 7B). Polysomes of PP242-treated embryos were prepared at 90 min post-fertilization, at the time of M-phase in the control (Fig. 2). As observed in *P. lividus*, Cyclin B mRNA recruitment into active polysomes was partially inhibited by PP242 (Fig. 7B-C).

Therefore Cyclin B mRNA recruitment into active polysomes triggered by fertilization in both sea urchins is under the control of at least two different mechanisms, a PP242-sensitive pathway and a PP242-insensitive pathway.

Discussion

In this study, we demonstrate that PP242 severely affected M-phase entry triggered by fertilization of sea urchin eggs. The initial target of PP242-induced inhibition would be the 4E-BP translational inhibitor, which remained undegraded in the presence of the drug. PP242 binds to the ATP-site of mTOR to inhibit both TORC1 and TORC2 (Feldman et al., 2009). 4E-BPs are well-characterized downstream targets of TORC1 (reviewed in (Fonseca et al., 2014)). The present results confirm and extend our previous works (Laurent et al., 2014; Salaun et al., 2003) showing that 4E-BP is degraded in a mTOR-sensitive pathway triggered by sea urchin egg fertilization. A few reports (Elia et al., 2008; Yanagiya et al., 2012) had been published related to the control of 4E-BPs stability in mammals *via* ubiquitination and degradation by the proteasome. In mammal cells, ⁵⁷Lys was the potential ubiquitination site in 4E-BP1 and only hypophosphorylated 4E-BP1 could be degraded, suggesting that 4E-BP degradation proceeds only when 4E-BP is not accessible to mTOR kinase activity. Therefore this mechanism could not account for the observed effect of PP242 in sea urchin embryo. Moreover, neither ⁵⁷Lys nor ⁶⁹Lys and ¹⁰⁵Lys present in human 4E-BP1 are conserved in sea urchins (Morales et al., 2006; Oulhen et al., 2009). Thus it is likely that mTOR-mediated regulation of 4E-BP degradation relies on another molecular mechanism that remains to elucidate. Since many reports indicate that the 4E-BPs are functionally inactivated in cancer cells by major oncogenic signaling pathways (Martineau et al., 2013), elucidation of the molecular mechanism involved in the mTOR-mediated regulation of 4E-BP degradation remains a major challenge. Our current work, providing evidence that 4E-BP degradation depends on mTOR-directed phosphorylation, confirms the strength of the sea urchin embryo as a model for the study of such mechanisms.

Importantly, our data show that the fertilization-induced accumulation of Cyclin B protein is repressed under mTOR pathway inhibition in both sea urchin species *P. lividus* and *S. granularis*. We demonstrate that Cyclin B mRNA recruitment into active polysomes is impacted by PP242 treatment of the eggs. This result definitely demonstrates that sea urchin egg fertilization stimulated the cap-dependent initiation of Cyclin B mRNA translation *via* the mTOR-induced 4E-BP degradation.

In addition, our data further support two attractive conclusions. On the one hand, the partial inhibition of Cyclin B mRNA recruitment by PP242 treatment suggests that an additional mechanism, independent from 4E-BP level and insensitive to mTOR pathway, is involved in the recruitment of the Cyclin B mRNA. This alternative pathway for Cyclin B

translation remains to be uncovered in sea urchin. Some reports have put forward 3'UTR-binding proteins in the control of Cyclin B mRNA translation in different species (reviewed in (Kronja and Orr-Weaver, 2011)). As an example, the RNA-binding protein CPEB (Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein) binds specific sequence in the 3'UTR region of the messenger, determines polyadenylation status, and consequently translational efficiency of its target mRNAs. In *Xenopus* oocyte, Maskin, which is a CPEB-interacting protein, sequesters eIF4E and suppresses translation (Stebbins-Boaz et al., 1999). Therefore, Maskin serves as a classical example of a protein that connect 3'UTR and cap, through the link between a 3'UTR-bound protein and eIF4E, to inhibit translation initiation. Alternative mechanisms have since been identified involving an ovary specific eIF4E and the eIF4E-binding protein 4E-T (Minshall et al., 2007). CPEB-mediated control of Cyclin B1 translation is critical for *Xenopus* embryonic division (Groisman et al., 2002). In starfish oocytes, we showed that Cyclin B translation during meiotic maturation is correlated with the phosphorylation and the dissociation of CPEB from eIF4E (Lapasset et al., 2008). Sea urchin contains genes involved in cytoplasmic polyadenylation such as CPEB, CPSF and Symplekin (reviewed in (Morales et al., 2006)), and egg fertilization is associated with an increase in the polyadenylation of mRNAs (Wilt, 1977). However, it was reported (Spieth and Whiteley, 1980) that sea urchin development prior to hatching are not affected by cordycepin, an inhibitor of RNA adenylation, suggesting that CPEB-mediated polyadenylation is not required for the first mitotic divisions in sea urchin.

In *Drosophila* ovaries and syncytial embryos, the PAN GU (PNG) kinase complex regulates the developmental translation of Cyclin B (Vardy and Orr-Weaver, 2007). PNG acts as an antagonist of PUMILIO-dependent translational repression, which represses Cyclin B translation by binding the *cis*-acting Nanos Response Element (NRE) in the 3'UTR and by recruiting nanos (Sonoda and Wharton, 2001). Sea urchin embryos contain three nanos homologs. However, nanos mRNAs are only expressed in small micromeres (Oulhen and Wessel, 2014), suggesting that the regulation of Cyclin B translation following fertilization in sea urchin is independent of nanos.

Finally, Vasa, a broadly conserved ATP-dependent RNA helicase, has been reported to regulate the *in vitro* translation of Cyclin B mRNA in a dual-luciferase assay in four- to eight-cell stage lysates of sea urchin embryos (Yajima and Wessel, 2011). Since Vasa protein and mRNA are present uniformly throughout the egg and early embryo (Voronina et al., 2008), Vasa could play a potential role in Cyclin B mRNA translation regulation following fertilization.

Since a significant pool of Cyclin B mRNA remains recruited and therefore actively translated in the presence of PP242, a second exciting conclusion drawn by our data came from the finding that Cyclin B protein remains at its low basal level in presence of the drug (Fig. 5). The intracellular level of a protein results from an equilibrium between its translation and its degradation rates. Therefore it can be assumed that the degradation activity of Cyclin B protein must be high in PP242-treated embryos in order to maintain a low level of Cyclin B despite the mTOR insensitive recruitment of Cyclin B mRNA triggered by fertilization. The simplest hypothesis to fit these data would be that fertilization triggers (1) the increase in Cyclin B mRNA translation *via* both a mTOR-dependent- and a mTOR-independent recruitment of Cyclin B mRNA and (2) the inhibition of Cyclin B protein degradation *via* mTOR-signaling pathway.

Altogether our work brings important clues on the control of Cyclin B translation *via* mTOR signaling, and underlines the fine-tuning orchestration of mitotic cyclins translation after fertilization in sea urchin.

Acknowledgments

We thank T. Lepage and P. Dru for granting access to the *P. lividus* transcriptome at (<http://octopus.obs-vlfr.fr/>). We thank the SMO and M3 services of the Station Biologique for collection and maintenance of sea urchins. We thank Lizenn Delisle and Rhiann Dodds for technical assistance. This work is supported by research grants from “La Ligue contre le Cancer (coordination du Grand Ouest (comités Finistère, Côtes d'Armor, Deux-Sèvres, Morbihan))”, the “Région Bretagne”, and the “Conseil Général du Finistère”; by ITMO AVIESAN CNRS/INSERM for equipment grant.

References

- Bah, A., Vernon, R.M., Siddiqui, Z., Krzeminski, M., Muhandiram, R., Zhao, C., Sonenberg, N., Kay, L.E., Forman-Kay, J.D., 2014. Folding of an intrinsically disordered protein by phosphorylation as a regulatory switch. *Nature* 519, 106-109.
- Cameron, R.A., Samanta, M., Yuan, A., He, D., Davidson, E., 2009. SpBase: the sea urchin genome database and web site. *Nucleic acids research* 37, D750-754.
- Cormier, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Sonenberg, N., Belle, R., 2001. eIF4E association with 4E-BP decreases rapidly following fertilization in sea urchin. *Dev Biol* 232, 275-283.
- Cormier, P., Pyronnet, S., Salaun, P., Mulner-Lorillon, O., Sonenberg, N., 2003. Cap-dependent translation and control of the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res* 5, 469-475.
- Elia, A., Constantinou, C., Clemens, M.J., 2008. Effects of protein phosphorylation on ubiquitination and stability of the translational inhibitor protein 4E-BP1. *Oncogene* 27, 811-822.
- Epel, D., 1967. Protein synthesis in sea urchin eggs: a "late" response to fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 57, 899-906.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., Hunt, T., 1983. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389-396.
- Faye, M.D., Graber, T.E., Holcik, M., 2014. Assessment of selective mRNA translation in mammalian cells by polysome profiling. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e52295.
- Feldman, M.E., Apsel, B., Uotila, A., Loewith, R., Knight, Z.A., Ruggero, D., Shokat, K.M., 2009. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS biology* 7, e38.
- Fernandez-Guerra, A., Aze, A., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Cosson, B., Cormier, P., Bradham, C., Adams, N., Robertson, A.J., Marzluff, W.F., Coffman, J.A., Genevriere, A.M., 2006. The genomic repertoire for cell cycle control and DNA metabolism in *S. purpuratus*. *Dev Biol* 300, 238-251.
- Fonseca, B.D., Smith, E.M., Yelle, N., Alain, T., Bushell, M., Pause, A., 2014. The ever-evolving role of mTOR in translation. *Seminars in cell & developmental biology* 36, 102-112.
- Genevriere-Garrigues, A.M., Barakat, A., Doree, M., Moreau, J.L., Picard, A., 1995. Active cyclin B-cdc2 kinase does not inhibit DNA replication and cannot drive prematurely fertilized sea urchin eggs into mitosis. *Journal of cell science* 108 (Pt 7), 2693-2703.
- Gingras, A.C., Raught, B., Sonenberg, N., 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual review of biochemistry* 68, 913-963.
- Groisman, I., Jung, M.Y., Sarkissian, M., Cao, Q., Richter, J.D., 2002. Translational control of the embryonic cell cycle. *Cell* 109, 473-483.
- Guertin, D.A., Sabatini, D.M., 2009. The pharmacology of mTOR inhibition. *Science signaling* 2, pe24.

- Hernandez, G., 2009. On the origin of the cap-dependent initiation of translation in eukaryotes. *Trends in biochemical sciences* 34, 166-175.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M.A., Hall, A., Hall, M.N., 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature cell biology* 6, 1122-1128.
- Jagus, R., Huang, W.I., Hansen, L.J., Wilson, M.A., 1992. Changes in rates of protein synthesis and eukaryotic initiation factor-4 inhibitory activity in cell-free translation systems of sea urchin eggs and early cleavage stage embryos. *The Journal of biological chemistry* 267, 15530-15536.
- Kahvejian, A., Svitkin, Y.V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M.N., Sonenberg, N., 2005. Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes & development* 19, 104-113.
- Kang, Q., Pomerening, J.R., 2012. Punctuated cyclin synthesis drives early embryonic cell cycle oscillations. *Molecular biology of the cell* 23, 284-296.
- Kronja, I., Orr-Weaver, T.L., 2011. Translational regulation of the cell cycle: when, where, how and why? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 366, 3638-3652.
- Kwon, Y.G., Lee, S.Y., Choi, Y., Greengard, P., Nairn, A.C., 1997. Cell cycle-dependent phosphorylation of mammalian protein phosphatase 1 by cdc2 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2168-2173.
- Lapasset, L., Pradet-Balade, B., Verge, V., Lozano, J.C., Oulhen, N., Cormier, P., Peaucellier, G., 2008. Cyclin B synthesis and rapamycin-sensitive regulation of protein synthesis during starfish oocyte meiotic divisions. *Mol Reprod Dev* 75, 1617-1626.
- Laplane, M., Sabatini, D.M., 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274-293.
- Laurent, S., Richard, A., Mulner-Lorillon, O., Morales, J., Flament, D., Glippa, V., Bourdon, J., Gosselin, P., Siegel, A., Cormier, P., Belle, R., 2014. Modelization of the regulation of protein synthesis following fertilization in sea urchin shows requirement of two processes: a destabilization of eIF4E:4E-BP complex and a great stimulation of the 4E-BP-degradation mechanism, both rapamycin-sensitive. *Frontiers in genetics* 5, 117.
- Le Breton, M., Cormier, P., Belle, R., Mulner-Lorillon, O., Morales, J., 2005. Translational control during mitosis. *Biochimie* 87, 805-811.
- Lewis, C.W., Taylor, R.G., Kubara, P.M., Marshall, K., Meijer, L., Golsteyn, R.M., 2013. A western blot assay to measure cyclin dependent kinase activity in cells or in vitro without the use of radioisotopes. *FEBS letters* 587, 3089-3095.
- Lin, T.A., Kong, X., Haystead, T.A., Pause, A., Belsham, G., Sonenberg, N., Lawrence, J.C., Jr., 1994. PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science* 266, 653-656.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., Hall, M.N., 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular cell* 10, 457-468.

- Lopo, A.C., Lashbrook, C.C., Hershey, J.W., 1989. Characterization of translation systems in vitro from three developmental stages of *Strongylocentrotus purpuratus*. *The Biochemical journal* 258, 553-561.
- Lozano, J.C., Schatt, P., Marques, F., Peaucellier, G., Fort, P., Feral, J.P., Genevriere, A.M., Picard, A., 1998. A presumptive developmental role for a sea urchin cyclin B splice variant. *The Journal of cell biology* 140, 283-293.
- Ma, X.M., Blenis, J., 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, 307-318.
- Malumbres, M., 2014. Cyclin-dependent kinases. *Genome biology* 15, 122.
- Martineau, Y., Azar, R., Bousquet, C., Pyronnet, S., 2013. Anti-oncogenic potential of the eIF4E-binding proteins. *Oncogene* 32, 671-677.
- Merrick, W.C., Hensold, J.O., 2001. Analysis of eukaryotic translation in purified and semipurified systems. *Current protocols in cell biology*, Chapter 11, Unit 11.9.
- Minshall, N., Reiter, M.H., Weil, D., Standart, N., 2007. CPEB interacts with an ovary-specific eIF4E and 4E-T in early *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 282, 37389-37401.
- Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Cosson, B., Morin, E., Belle, R., Bradham, C.A., Beane, W.S., Cormier, P., 2006. Translational control genes in the sea urchin genome. *Dev Biol* 300, 293-307.
- Oulhen, N., Boulben, S., Bidinosti, M., Morales, J., Cormier, P., Cosson, B., 2009. A variant mimicking hyperphosphorylated 4E-BP inhibits protein synthesis in a sea urchin cell-free, cap-dependent translation system. *PLoS One* 4, e5070.
- Oulhen, N., Mulner-Lorillon, O., Cormier, P., 2010. eIF4E-binding proteins are differentially modified after ammonia versus intracellular calcium activation of sea urchin unfertilized eggs. *Mol Reprod Dev* 77, 83-91.
- Oulhen, N., Salaun, P., Cosson, B., Cormier, P., Morales, J., 2007. After fertilization of sea urchin eggs, eIF4G is post-translationally modified and associated with the cap-binding protein eIF4E. *J Cell Sci* 120, 425-434.
- Oulhen, N., Wessel, G.M., 2014. Every which way--nanos gene regulation in echinoderms. *Genesis* 52, 279-286.
- Pause, A., Belsham, G.J., Gingras, A.C., Donze, O., Lin, T.A., Lawrence, J.C., Jr., Sonenberg, N., 1994. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371, 762-767.
- Poulin, F., Gingras, A.C., Olsen, H., Chevalier, S., Sonenberg, N., 1998. 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *The Journal of biological chemistry* 273, 14002-14007.
- Rousseau, D., Gingras, A.C., Pause, A., Sonenberg, N., 1996. The eIF4E-binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth. *Oncogene* 13, 2415-2420.
- Salaun, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Belle, R., Sonenberg, N., Cormier, P., 2003. eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo. *Dev Biol* 255, 428-439.

- Sodergren, C., and the Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, 2006. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* 314, 941-952.
- Smith, A.B., Pisani, D., Mackenzie-Dodds, J.A., Stockley, B., Webster, B.L., Littlewood, D.T., 2006. Testing the molecular clock: molecular and paleontological estimates of divergence times in the Echinoidea (Echinodermata). *Molecular biology and evolution* 23, 1832-1851.
- Sonoda, J., Wharton, R.P., 2001. *Drosophila* Brain Tumor is a translational repressor. *Genes & development* 15, 762-773.
- Spith, J., Whiteley, A.H., 1980. Effect of 3'-deoxyadenosine (cordycepin) on the early development of the sand dollar, *Dendraster excentricus*. *Developmental biology* 79, 95-106.
- Stebbins-Boaz, B., Cao, Q., de Moor, C.H., Mendez, R., Richter, J.D., 1999. Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E. *Molecular cell* 4, 1017-1027.
- Topisirovic, I., Svitkin, Y.V., Sonenberg, N., Shatkin, A.J., 2011. Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 2, 277-298.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Vardy, L., Orr-Weaver, T.L., 2007. The *Drosophila* PNG kinase complex regulates the translation of cyclin B. *Developmental cell* 12, 157-166.
- Voronina, E., Lopez, M., Juliano, C.E., Gustafson, E., Song, J.L., Extavour, C., George, S., Oliveri, P., McClay, D., Wessel, G., 2008. Vasa protein expression is restricted to the small micromeres of the sea urchin, but is inducible in other lineages early in development. *Developmental biology* 314, 276-286.
- Voronina, E., Marzluff, W.F., Wessel, G.M., 2003. Cyclin B synthesis is required for sea urchin oocyte maturation. *Developmental biology* 256, 258-275.
- Wagenaar, E.B., 1983. The timing of synthesis of proteins required for mitosis in the cell cycle of the sea urchin embryo. *Experimental cell research* 144, 393-403.
- Wilt, F.H., 1977. The dynamics of maternal poly(A)-containing mRNA in fertilized sea urchin eggs. *Cell* 11, 673-681.
- Yajima, M., Wessel, G.M., 2011. The DEAD-box RNA helicase Vasa functions in embryonic mitotic progression in the sea urchin. *Development* 138, 2217-2222.
- Yanagiya, A., Suyama, E., Adachi, H., Svitkin, Y.V., Aza-Blanc, P., Imataka, H., Mikami, S., Martineau, Y., Ronai, Z.A., Sonenberg, N., 2012. Translational homeostasis via the mRNA cap-binding protein, eIF4E. *Molecular cell* 46, 847-858.

Figure legends

Figure. 1: PP242 affects the first mitotic division of *S. granularis* embryos. (A) Dose-response effect of PP242 on the first mitotic division of sea urchin early development. Batches of *S. granularis* eggs (5% cells/vol solution in FSW) were pre-incubated 15 min before sperm addition with DMSO (circles) or 3 μ M (square), 10 μ M (triangles) or 30 μ M (diamonds) PP242. Cleavage rates were scored at different times during the 4h30 culture in the continuous presence of the drug. The curve was obtained from the eggs isolated from a single female and was representative of 8 independent experiments. (B) Microscopic observation of nuclear envelope (a-g) and chromatin (a'-g') morphology in control (a-d and a'-d') and 10 μ M PP242-treated embryos (e-g and e'-g') at the indicated times post-fertilization.

Figure. 2: PP242 inhibits 4E-BP degradation triggered by fertilization. (A) Total amounts of 4E-BP in extract from control or PP242-treated eggs of *S. granularis*, obtained as in Figure. 2 were analyzed by Western blotting using anti-sea urchin 4E-BP antibodies (top panels). PSTAIR antibody was used as a loading control (bottom panels). (B) Quantification of the results obtained from control (circles) or PP242 treated (triangles) eggs. 4E-BP amount was normalized against PSTAIR level, and expressed as a percentage of the value obtained in unfertilized eggs. The results shown are average values (+/- SEM) obtained in 6 independent experiments.

Figure. 3: PP242 inhibits the increase in protein synthesis triggered by fertilization. (A) The rate of *in vivo* protein synthesis was monitored by the kinetics of [³⁵S]-methionine incorporation into proteins. *S. granularis* eggs (5% cells/vol solution in FSW) were metabolically labelled in the presence of [³⁵S]-methionine. After fertilization in the absence (circles) or presence (triangles) of 10 μ M PP242, cytosoluble fractions were prepared from 20 μ l pelleted embryos and radioactivity incorporation into TCA-precipitated proteins was determined at indicated times. (B) Pattern of proteins translated following fertilization of control (left panel) or PP242-treated (right) eggs. Proteins (30 μ g) of the cytosoluble fractions were separated by SDS-PAGE (12%). Radioactive neosynthesized proteins were visualized by autoradiography. The results shown are average values (+/- SEM) obtained in 3 independent experiments.

Figure. 4: PP242 delays Cyclin B/CDK1 complex activation triggered by fertilization. (A) *S. granularis* eggs were fertilized in the absence (control) or presence of PP242

(10 μ M). Aliquots of total extracts from 20 μ l pelleted embryos taken at indicated times post-fertilization were resolved by 12% SDS-PAGE and subjected to Western blotting analysis using phospho³²⁰T-PP1C α . PSTAIR antibody was used as a loading control (bottom panels). **(B)** Quantification of the results obtained from control (circles) or PP242 treated (triangles) eggs. Phospho³²⁰T-PP1C α were normalized against PSTAIR levels obtained at the same time and expressed as a ratio of the value obtained in unfertilized eggs. This figure is representative of 6 independent experiments.

Figure. 5: PP242 delays Cyclin B protein accumulation triggered by fertilization. **(A)**

Total amount of Cyclin B in extracts from control or PP242-treated eggs of *S. granularis*, obtained at indicated times post-fertilization, was monitored by Western blotting using anti-Cyclin B (top panels). PSTAIR antibody was used as a loading control (bottom panels). **(B)** Quantification of the results obtained from control (circles) or PP242-treated (triangles) eggs. Cyclin B amount was normalized against PSTAIR level and expressed as a ratio of the value obtained with unfertilized eggs. These figures are representative of 6 independent experiments.

Figure. 6: PP242 affects early embryonic development in *P. lividus*. **(A)** PP242 delays the

first mitotic division triggered by fertilization. *P. lividus* eggs were incubated 15min before sperm addition with DMSO (circles) or 10 μ M PP242 (triangles). **(B)** PP242 affects the increase of protein synthesis. Embryos were metabolically labelled in the presence of [³⁵S]-methionine and the rate of *in vivo* protein synthesis was monitored in fertilized eggs in absence (circles) or presence of 10 μ M PP242 (triangles). **(C)** Pattern of proteins translated following fertilization of control (left panel) or PP242-treated (right) eggs. **(D)** PP242 inhibits 4E-BP degradation triggered by fertilization. Total amount of 4E-BP in unfertilized (UnF) or 60 min post-fertilized (F) eggs treated or not with PP242 was analyzed by Western blotting using sea urchin 4E-BP antibodies (bottom panel). eIF4E antibody was used as a loading control (top panel). **(E)** PP242 affects Cyclin B/CDK1 activation triggered by fertilization. Cyclin B/CDK1 activation was monitored by Western blot analysis of the phospho³²⁰T-PP1C α . PSTAIR antibody was used as a loading control. These figures are representative of 3 complete sets of experiments done with different females.

Figure. 7: PP242 affects mitotic Cyclin B mRNAs recruitment into active polysomes following fertilization in sea urchins. mRNAs were detected by RT-PCR amplification

in each fraction of polysome gradients from control (filled circles), PP242-treated (filled triangles) or PP242-puromycin-treated (empty triangles) embryos. *P. lividus* and *S. granularis* embryos were respectively taken at 60min and 90min post-fertilization. Amplicons were run on agarose gels, quantified using Image J software, and repartition was shown along the different fractions of the gradient as a percentage of total mRNA. Polysomal fractions are visualized by a grey box. **(A)** PP242 partially inhibits the recruitment of Pl. Cyclin B mRNA into active polysomes (representative of six independent experiments) **(B)** PP242 partially inhibits the recruitment of Sg. Cyclin B mRNA into active polysomes (representative of two independent experiments). **(C)** The area-under-the curve from fractions 15 to 21 was quantified. Significance for data obtained from six independent experiments using *P. lividus* eggs was assessed using Fisher's F-test and Student's t- test. * $p < 0.01$.

Legends to supplementary figures

Figure S1: Cyclin B is recruited into active polysomes following fertilization in sea urchins. Cyclin B was detected by RT-PCR amplification in each fraction of the polysome gradient from unfertilized eggs (UnF: filled squares), 60 min post-fertilization embryos cultivated in absence (F: filled circles) or in presence of puromycin (F+puro: empty circles) Amplicons were run on agarose gels, quantified using Image J software and repartition was shown along the different fractions of the polysome gradient as a percentage of total mRNA. Polysomal fractions are visualized by grey box. In fertilized eggs, Cyclin B mRNAs were recruited into the polysome fractions in both species. Puromycin treatment (empty circles) dissociated active polysomes and triggered a shift of Cyclin B from polysomal to monosomal fractions.

Figures

Figure. 1

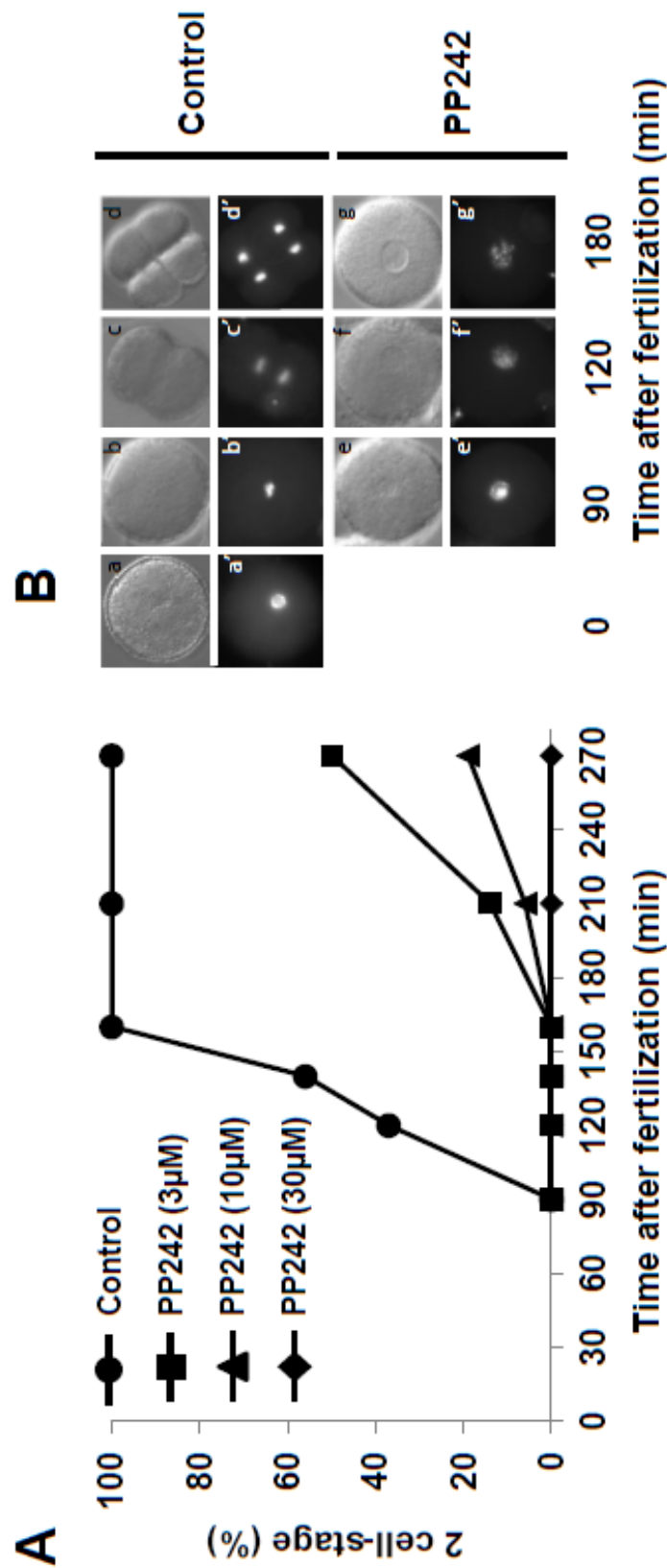


Figure. 2

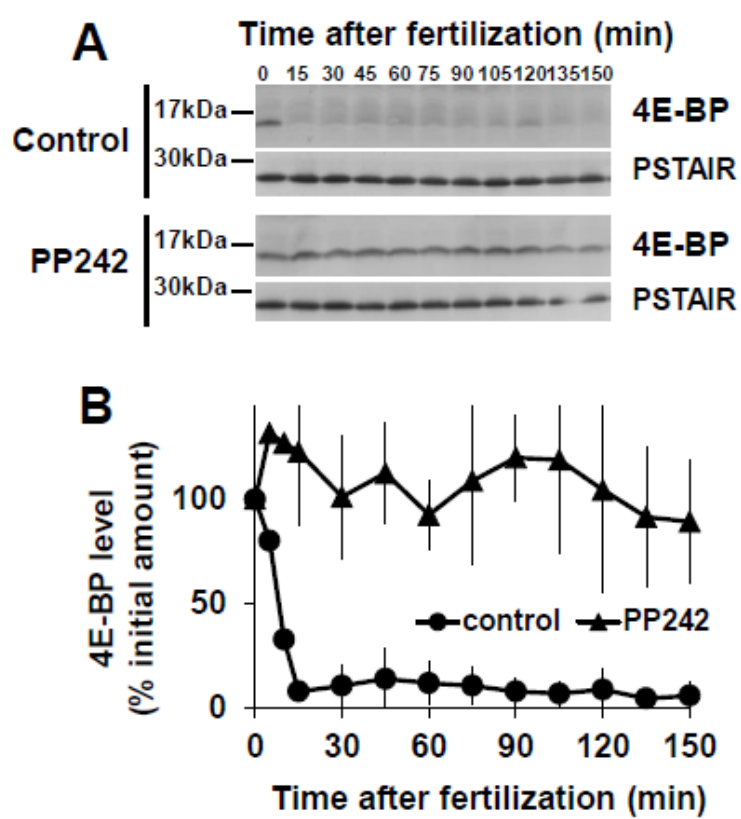


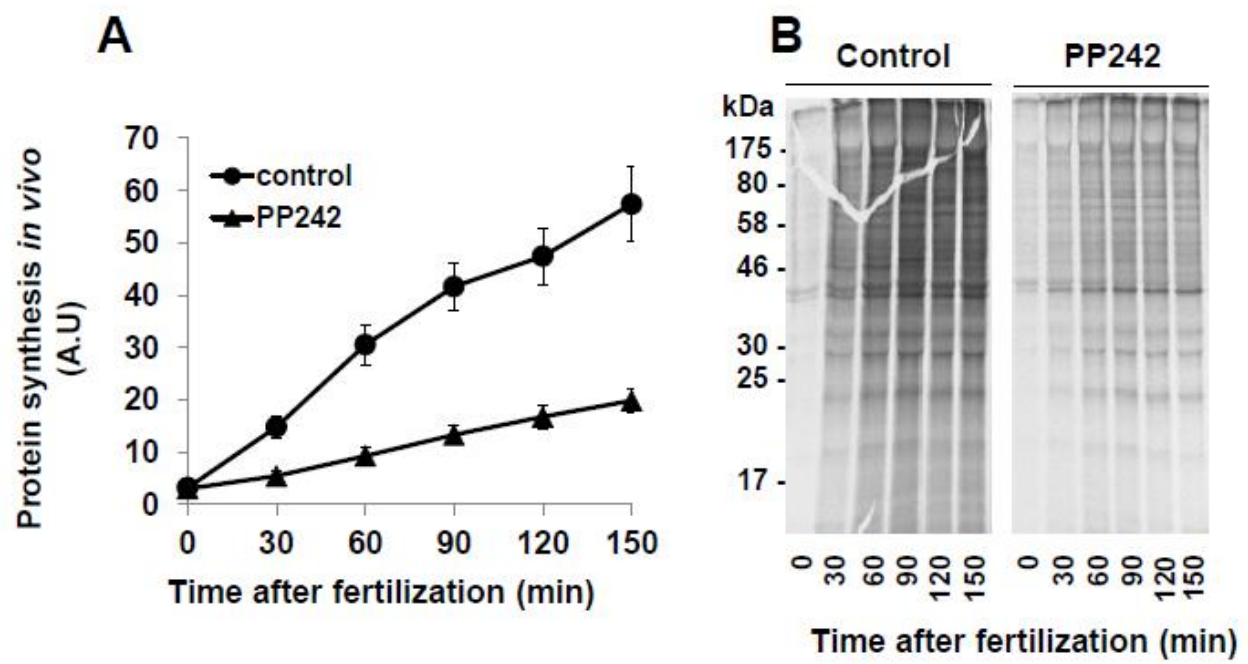
Figure. 3

Figure. 4

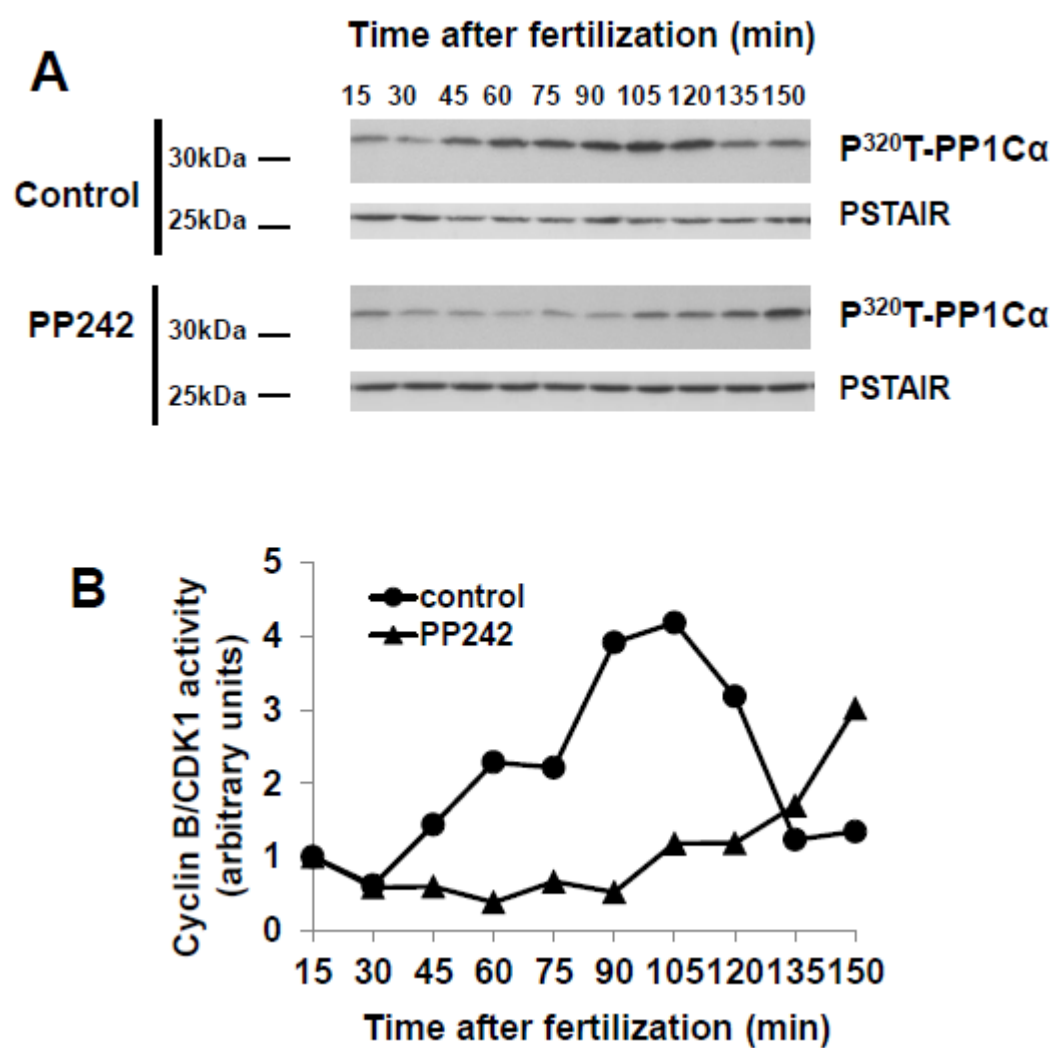


Figure. 5

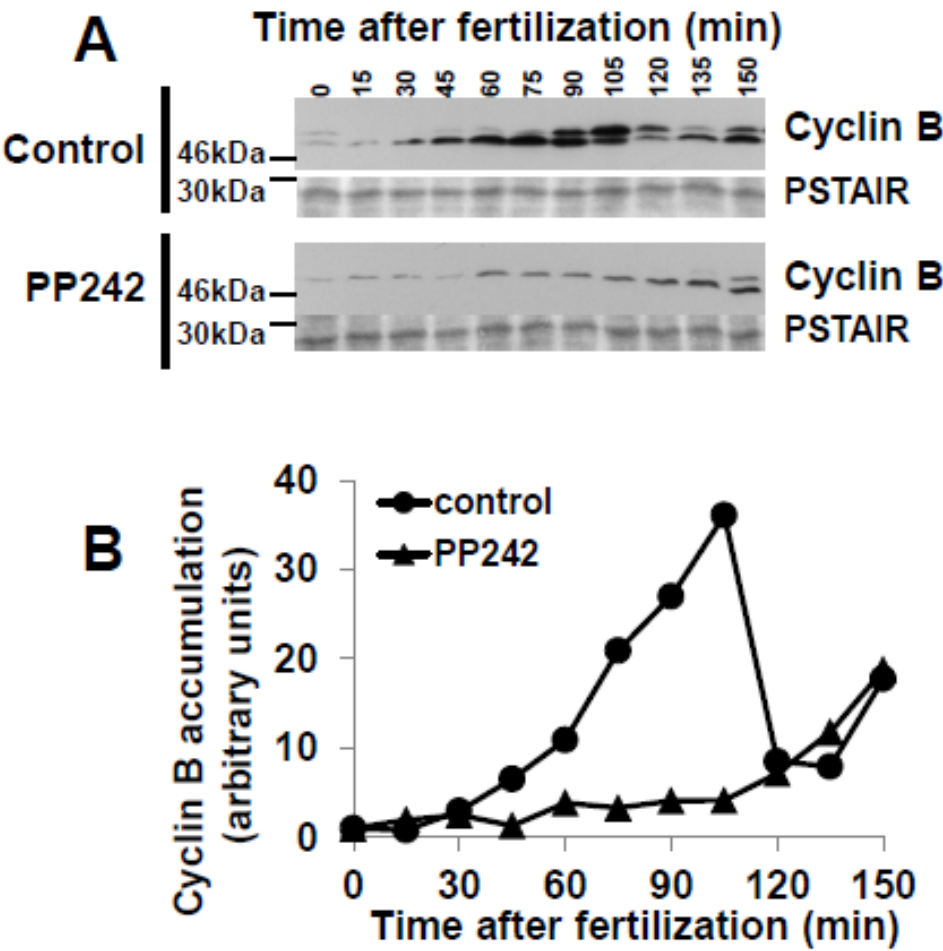


Figure. 6

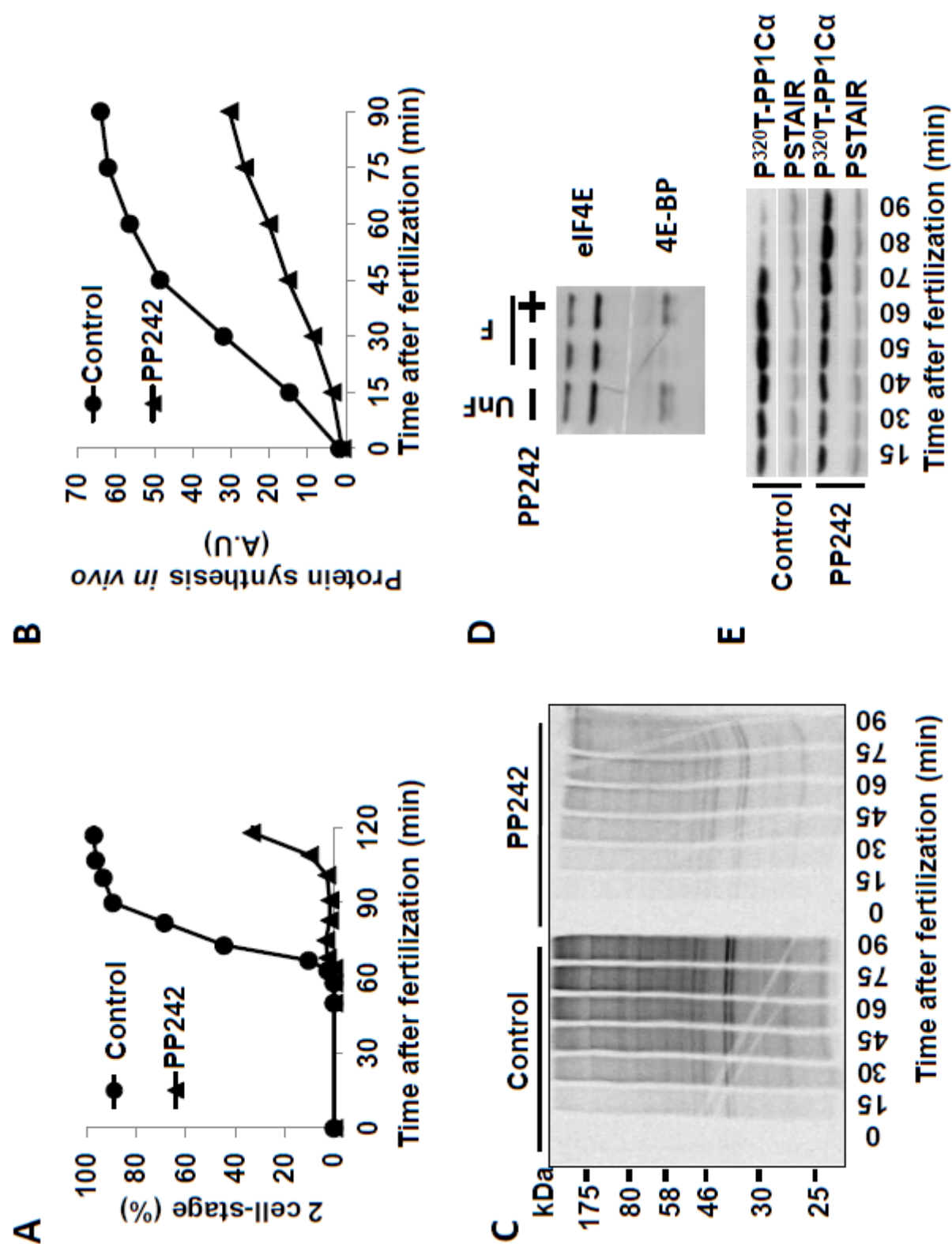
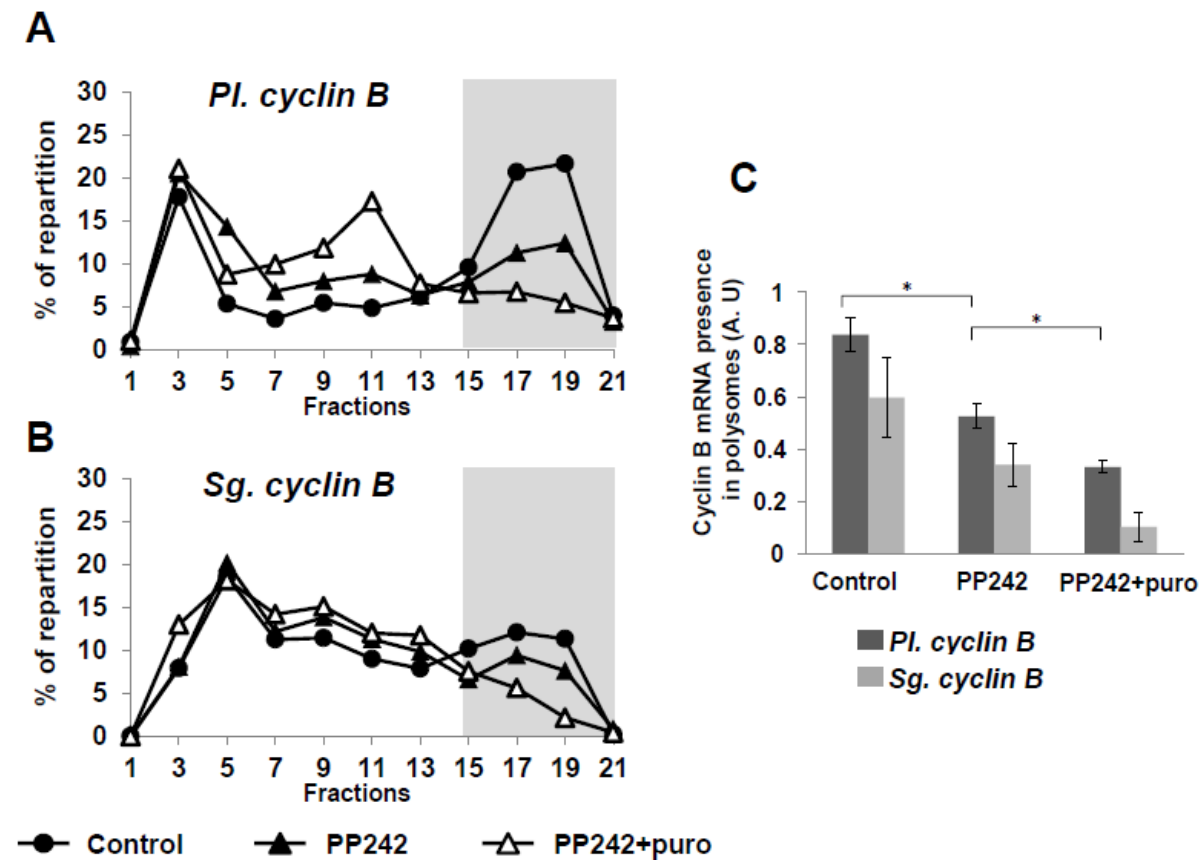
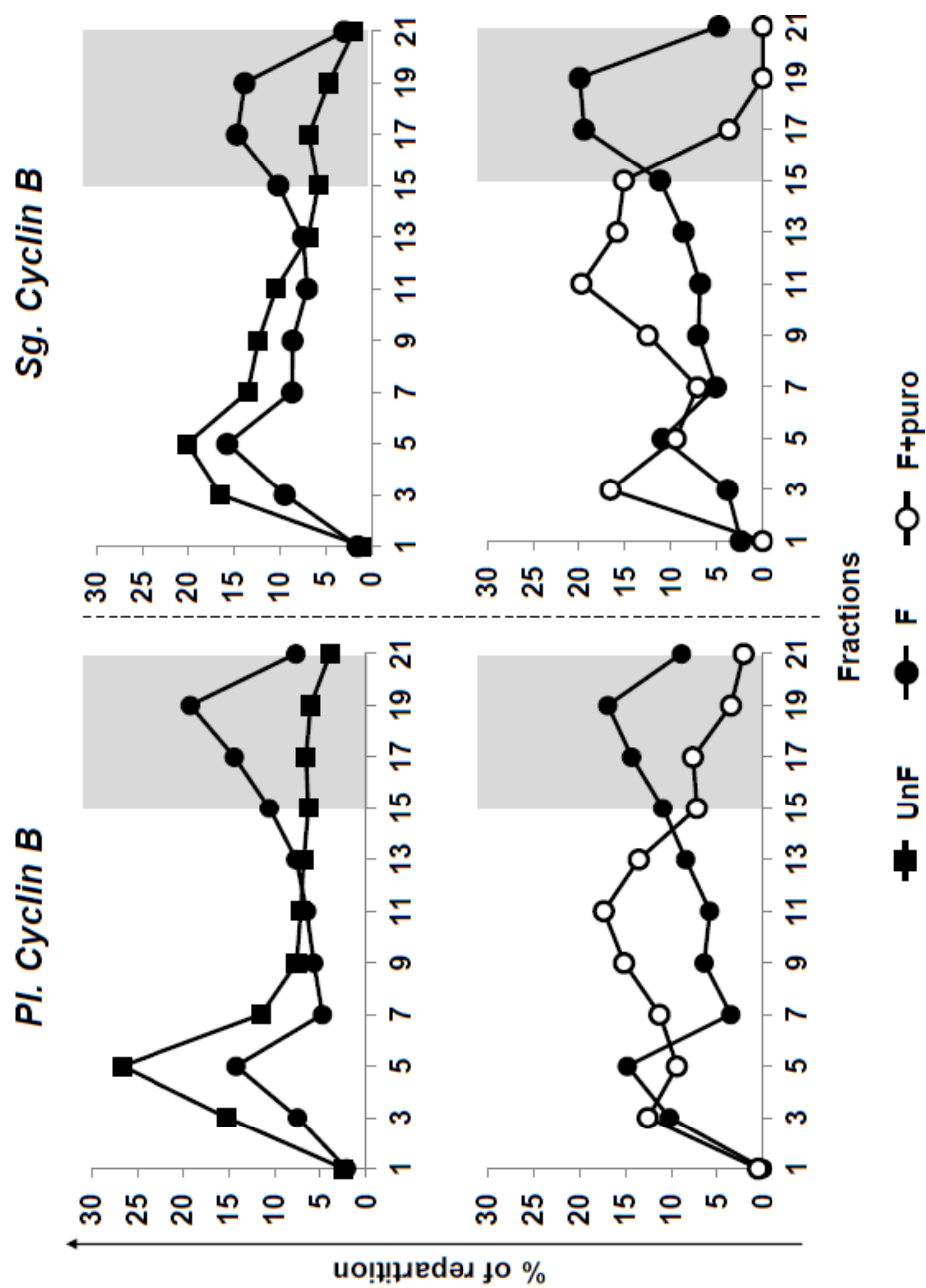


Figure. 7



Supplementary Figures

Figure. S1



3. Article 3

« Sea urchin translatome at fertilization »

Chassé, H., Boulben, S., Aubert, J., Le Corguillé, G., Corre, E., Cormier, P., Morales, J.,
(2015)

En préparation

Le développement embryonnaire précoce de l'oursin est un excellent modèle d'étude du contrôle traductionnel, car jusqu'à l'activation du génome zygotique, la traduction des ARNm maternels stockés dans l'ovocyte dirigent les premiers cycles cellulaires, indépendamment de la transcription. Dans les œufs non-fécondés la synthèse protéique est bloquée ; la fécondation provoque une activation de la machinerie traductionnelle et le recrutement polysomal des messagers maternels. L'augmentation importante de synthèse protéique est indispensable au départ du développement embryonnaire.

Dans cet article, nous avons établi les premiers traductomes avant et après la fécondation de l'embryon d'oursin. Leur analyse a permis de démontrer que les ARNm maternels ne sont pas uniformément recrutés dans les polysomes et traduits, mais qu'il existe une importante sélectivité, contrairement à ce qui est classiquement admis. Les catégories de transcrits préférentiellement recrutés dans les polysomes à la fécondation sont celles du « cycle cellulaire », de la « signalisation », et des « protéines de liaison à l'ARN », soit des transcrits codant des protéines régulatrices (**Figure. 32**).

La voie de signalisation mTOR est fortement impliquée dans la régulation traductionnelle, en particulier à la fécondation de l'embryon d'oursin puisque son activité permet la libération d'eIF4E1 pour l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe. Par ailleurs il existe un lien fort entre la voie mTOR et la voie MAPK, tant dans le rôle, le mode d'activation, et par leurs inter-régulations. Ainsi, l'inhibition de la voie mTOR ou la double inhibition des voies mTOR et MAPK a permis de démontrer que la traduction est affectée différemment en fonction du transcrit et du type d'inhibition. Plusieurs catégories de réponse

se distinguent dans les deux cas : perte de la traduction du transcrit, diminution de sa traduction, et aucun effet sur son niveau de traduction. Par cette analyse, nous avons démontré que la traduction peut être sous le contrôle de mTOR, qu'il peut y avoir une prise de relai par la voie MAPK, et qu'il existe une initiation de la traduction indépendante de la coiffe, ou du moins indépendante d'eIF4E1 (**Figure. 32**). Cette étude a permis de démontrer pour la première fois chez l'oursin qu'une traduction indépendante de l'inhibition médiée par 4E-BP était possible, suggérant l'existence d'une initiation alternative.

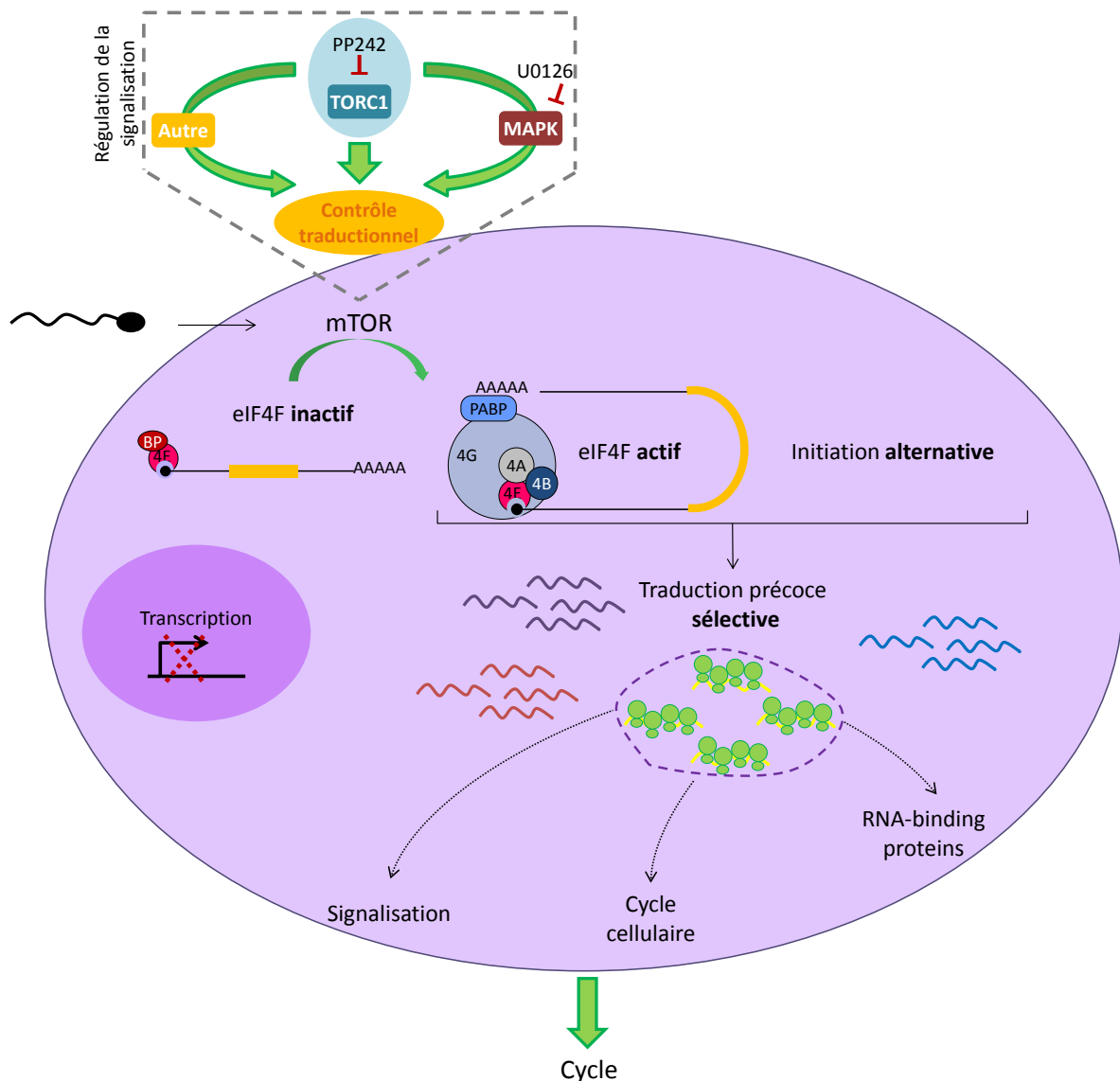


Figure. 32 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus suite à l'analyse du traductome de l'embryon d'oursin d'une cellule.

Translatome analysis at oocyte-to-embryo transition in sea urchin

Héloïse Chassé^{1,2}, Sandrine Boulben^{1,2}, Julie Aubert^{3,4}, Gildas Le Corguillé⁵, Erwan Corre⁵, Patrick Cormier^{1,2}, Julia Morales^{1,2*}

¹ CNRS, UMR 8227, Laboratory of Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, F-29688, Roscoff cedex, France

² Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 8227, Laboratory of Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, F-29688, Roscoff cedex, France

³ AgroParisTech, UMR518 MIA-Paris, F-75231 Paris Cedex 05, France

⁴ INRA, UMR518 MIA-Paris, F-75231 Paris Cedex 05, France

⁵ CNRS, UPMC, FR2424, ABiMS, Station Biologique, 29680, Roscoff, France.

* To whom correspondence should be addressed:

Tel: (33) 298292369; Email: morales@sb-roscoff.fr

Keywords: Translational control / polysome profiling / Fertilization / mTOR

Introduction

Protein synthesis is, in all living organisms, one of the most fundamental processes required for cell proliferation, cell differentiation, fast response to stress and environmental cues. Deciphering the machinery underlying protein synthesis as well as the biological functions of the produced proteins thus represent a key step towards a better comprehension of the functional mechanisms of the cell or an organism. Production of proteins from the genome relies on two steps: transcription (the DNA code is transcribed into messenger RNA) and translation (the messenger RNA is translated into protein). The level of a protein within a cell depends on the regulation of messenger RNA (mRNA) abundance by transcriptional regulation, but also on the rates of protein synthesis by the translational machinery as well as on the rate of protein degradation by the lysosome or proteasome pathways. Importantly, recent studies have established that almost half of the variation of protein concentration within a cell is due to the efficiency of translation (Schwanhäusser et al., 2011). Furthermore, translational control has been shown to be critical for protein production in response to a number of physiological and pathological situations, including development (Hershey et al., 2012). The term “translatome” that emerged in 2011 characterizes the subset of mRNAs present in the cell that are actively translated, *i.e.* that are associated with polysomes, thereby providing a very accurate reflection of the functional protein readout of the genome. Translatome analysis is made possible by carrying out polysome profiling coupled with high-throughput sequencing technologies (Kuersten et al., 2013; Larsson et al., 2012), which allows the identification of the sets of proteins that are produced under specific developmental, physiological or pathological conditions (1), deciphering the processes of selection and recruitment of mRNAs to polysomes (2), and establishing translational regulatory networks (3). Early embryonic development is an appropriate model to address the question of translational control. In sea urchins, translational activity is repressed in unfertilized eggs and a stockpile of maternal mRNAs is present in the eggs. From fertilization to the onset of zygotic transcription, maternal mRNAs drive cell cycles and the establishment of cell fates during the first cell divisions, independently of mRNA transcription and ribosome biogenesis. Fertilization triggers the activation of the translation machinery and the recruitment of mRNAs into polysomes, leading to an increase of protein synthesis. Upon fertilization, the stimulation of protein synthesis depends on the release of the cap-binding protein eIF4E from its translational repressor 4E-BP, and its association to the scaffolding protein eIF4G, depending on mTOR signaling (Cormier et al., 2001; Salaun et al., 2003;

Oulhen et al., 2007). Moreover, screens of sea urchin cDNA libraries prepared from polysomal mRNA followed by analyses of their translational status at various developmental stages, revealed the unmasking of a few maternally stored mRNAs and their integration into polysomes (*e.g.* (Alexandraki and Ruderman, 1985; Kelso-Winemiller et al., 1993; Le Breton et al., 2003). To date no large-scale analysis of translated mRNAs in sea urchin is available.

We focused on the oocyte-to-embryo transition, by comparing the translated mRNAs in unfertilized eggs and in 1-cell post-fertilization embryo. We analyzed the recruitment of maternal mRNAs triggered by fertilization, using RNA-sequencing of polysomal fractions. The determination of the embryo translome allowed us to demonstrate that only a fraction of the maternal mRNAs is recruited after fertilization, with enrichment of biological functions such as “cell cycle”, “signaling” and “RNA-binding proteins”. Furthermore, we showed that all mRNAs translated after fertilization are not equally impacted by mTOR signaling inhibition, and the translation of some mRNAs were not impacted at all, suggesting the existence of a selective cap-independent translation initiation at fertilization in sea urchin.

Material and methods

Handling and treatment of Eggs and Embryos

Sea urchin (*Paracentrotus lividus*) were collected in the bay of Crozon (Brittany, France), and maintained in the CRBM facility (Marine Biological Station, Roscoff). Animals were induced to spawn by intracœlomic injection of 0.1M acetylcholine; gametes were collected in filtered sea water (FSW) and kept as a 5% dilution in FSW. Oocytes were dejellied in pH5 water for 45 seconds, washed in fresh FSW and fertilized. Embryos were cultured under constant stirring. Emetine [100µM] was added to eggs or embryos suspension 5 minutes before collection to freeze elongating polysomes on translated mRNAs, and samples were processed for polysomes analysis. Puromycin [300µg/ml] was added 20 minutes before collection when noted. PP242 and U0126 were added to eggs or embryos suspension when noted.

In vivo protein synthesis analysis

Embryos (5% suspension in seawater) were incubated in presence of [³⁵S]-L-methionine at the final concentration of 5µCi/ml and equivalent aliquots were removed at the indicated times. For pulse-labeling, eggs or embryos were taken one hour after fertilization and incubated in presence of [³⁵S]-L-methionine for 15 minutes at a final concentration of

10 μ Ci/ml. [35 S]-L-methionine incorporation into proteins was measured on duplicate aliquots after 10% TCA precipitation as described (Costache et al., 2012).

Proteins were separated on denaturing SDS-Polyacrylamide gel, and exposed to PhosphorImager screen. Western blot analysis was done after electrotransfer onto nitrocellulose membranes (Amersham). Antibodies directed against sea urchin 4E-BP (1:5000; Oulhen et al., 2010), eIF4E (1:1000; Transduction laboratories) were used in TBS-T / 1% bovine serum albumin. Secondary peroxidase conjugated antibodies (DAKO) were used at 1:10000 dilution in TBS-T / 1% BSA. Revelation was done using Pierce ECL 2 Western blotting substrate (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions on a Typhoon Imager (GE Healthcare Life Sciences). Quantification was done using the public domain NIH Image program (written by Wayne Rasband at the US National Institutes of Health).

Polysome preparation

Equivalent number of eggs or embryos were collected at the indicated time points, and resuspended in polysome lysis buffer (10mM Tris pH7.4, 250mM KCl, 10mM MgCl₂, 25mM EGTA, 0.4% Igepal, 5% sucrose, 1mM DTT, 10 μ g/ml aprotinin, 2 μ g/ml leupeptin, 20U/ml RNasin, 10 μ g/ml emetine), lysed by 10 strokes in Dounce homogenizer, clarified by centrifugation at 13000rpm for 10 minutes. Lysates were then centrifuged through a 15-40% sucrose gradient in gradient buffer (10mM Tris pH7.4, 250mM KCl, 10mM MgCl₂, 25mM EGTA, 1mM DTT, and 20U/ml RNasin) for 2.5 hours at 38000 rpm in a SW41Ti rotor (Beckman). Puromycin-treated samples were incubated with KCl 0.5M 15 minutes at 4°C then 15 minutes at 37°C, before applying onto sucrose gradient. Gradients were collected with an ISCO gradient fractionator, coupled with an optical density recorder, in 21 equivalent fractions. RNA was extracted from each fraction using one volume of phenol pH4 / chloroform (v/v), and isopropanol precipitated in presence of glycogen carrier. RNA pellet was resuspended in RNase-free water. One tenth of the RNA was used for quality control on agarose gel. RNA was kept at -80°C until further use.

RNA-Seq libraries and sequencing

RNA-Seq data were generated from three independent polysome profiling experiments, comprising eight different samples as follow: cytoplasm and polysomal fractions, in unfertilized eggs and 1-hour (1-cell) post-fertilization embryos, and in absence or presence of puromycin (see supplementary **Table. S1**). All eight samples from a biological replicate are taken from eggs or embryos arising from a single female and male pair. The

independent experiments correspond to three independent sets of parents. An aliquot of lysate before polysome fractionation was taken for RNA extraction as cytoplasmic RNA samples. RNA was extracted using one volume of phenol pH4 / chloroform (v/v), and isopropanol precipitated. The RNA pellet is resuspended in RNase-free water, precipitated again with 2vol. ethanol 100% / 1/10th vol. sodium acetate 3M, and resuspended in RNase-free water. For polysomal RNA samples, RNA from heavy polysomal fractions (prepared as above) were pooled and precipitated with ethanol/sodium acetate, and resuspended in RNase-free water. Quality and quantity of RNA were assessed by Agilent Bioanalyzer to obtain the RNA integrity values (RIN) and concentration. Libraries were constructed with the Illumina Truseq mRNA-stranded kit, and sequenced using 100-base length read chemistry in a paired-end flow cell on Illumina HiSeq 2000. Both library building and sequencing were performed by McGill University and Genome Québec Innovation Centre. Description of the twenty-four libraries and corresponding data generated for this study were provided in Supplementary **Table. S1**.

Assembly of a maternal transcriptome by de novo pipeline

Raw reads were filtered from low-quality sequences, low-complexity sequences and trimmed using FASTX toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html). Reads were trimmed and filtered using a quality threshold of 25 (base calling) and a minimal size of 60bp. Only reads in which more than 75% of nucleotides had a minimal quality threshold of 20 were retained. Reads were then cleaned from rRNA contaminant using riboPicker (Schmieder et al., 2012) and cleaned from adapter ends using Cutadapt version 1.01. Finally the cleaning process was checked using FastQC (version 0.10.01 <http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>). Sequences from cytoplasmic RNAs corresponding to unfertilized and fertilized eggs (three independent samples for each condition) were assembled *de novo* using Trinity package (release 2013-02-25; Grabherr et al., 2011), the genome-independent transcriptome assembler. Finally, reads were remapped on the full transcriptome using Bowtie (version 0.12.8; (Langmead et al., 2009) and relative abundances were estimated using RSEM (version 1.2.0) to get the FPKM (Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped) values and thus identify low coverage contigs and rare isoforms (<1%) that were excluded later from the analysis (both software programs were launched through the Trinity package Wrapper `filter_fasta_by_rsem_values.pl`). For further analysis, the *de novo* transcriptome was filtered to remove transcripts with FPKM <5, leading to a final number of 43823 transcripts. The raw

read counts for each of the 6 Illumina libraries corresponding to unfertilized and fertilized eggs cytoplasmic RNAs (2 conditions, three biological replicates per condition) were used as input to the DESeq and EdgeR R packages (Anders and Huber, 2010; Robinson et al., 2010) to perform pairwise differential expression analysis cytoplasmic mRNA content before and after fertilization.

Peptide prediction was performed using Transdecoder (Haas et al., 2013). Similarity search (blastx of the transcripts and blastp of the Transdecoder predicted peptides) was performed against the uniprot-swissprot database (release 2013-09) and the Uniref90 database (release 2014-04). Peptide signal prediction was performed using signalP v4.0 (Petersen et al., 2011). Transmembrane peptides detection was performed using TMHMM v2.0c (Krogh et al., 2001). Protein domain search was performed using hmmscan from the hmmer v.3.1b1 suite against the Pfam-A database (release 27.0; Finn et al., 2014). Transcriptome functional annotation was performed using the Trinotate pipeline (<http://trinotate.github.io> described in Haas et al. 2013). Annotation was done using the *Strongylocentrotus purpuratus* genes Echinobase database (genome version 3.1) (<http://echinobase.org>; Cameron et al., 2009), assigning a best blastn hit with an e-value $<10^{-5}$ to 14002 transcripts, corresponding to 7685 Trinity 'genes'. This set was further used for translatoe analysis.

Functional Classes / GOterms

S.purpuratus genes with their associated functional classes as described in Tu et al., 2012 were retrieved from Echinobase (<http://echinobase.org>; Cameron et al, 2009). GOterm search was done on terms associated to Sp genes in Echinobase, and on the Trinotate annotation. Only the enriched functional classes with a $pval < 10^{-5}$ (binomial test) were considered.

Translatome analysis

The raw read counts from the 24 libraries (**Suppl. Table. S1**) were used to analyzed the translation profile of each transcript, generating three \log_2 fold change values to evaluate the translation status in unfertilized eggs (UnFvsUnFpuro), in fertilized eggs (FvsFpuro) and the recruitment into or exit from polysomal fractions induced by fertilization (FvsUnF). Normalization and differential analysis were carried out using the generalized linear model framework according to the EdgeR model and package (Robinson et al., 2010). For each gene g , we assumed that the observed count y_{ijg} from polysomal fraction of female i in group j follows a negative binomial distribution with a mean parameter μ_{ijg} . This mean parameter

depends on the sequencing depth for sample corresponding to female i in condition j s_{ij} , on the number of pooled polysome gradients nb_{ij} , on the relative abundance of enriched polysomal mRNA π_{ijg} and on the observed counts in the associated cytoplasmic mRNA y_{ijg}^c normalized by the corresponding sequencing depth s_{ij}^c and the number of gradients nb_{ij}^c .

$$E(y_{ijg}) = \mu_{ijg} = s_{ij} nb_{ij} \pi_{ijg} \frac{y_{ijg}^c}{s_{ij}^c nb_{ij}^c}$$

The model is the following one :

$$\log(\mu_{ijg}) = \kappa_{ijg} + (F)_i + (G)_j + \varepsilon_{ijg}$$

where $\kappa_{ijg} = \log(s_{ij}) + \log(nb_{ij}) + \log(y_{ijg}^c) - \log(s_{ij}^c) - \log(nb_{ij}^c)$

$(G)_j$ is the main effect of Group j ($j = \text{UnF}, \text{UnFpuro}, \text{F}, \text{Fpuro}$), $(F)_i$ is the main effect of female i ($i=1,2,3$) and ε_{ijg} is a random error term that is assumed to be independent between observations.

The scaling factors s_{ij} and s_{ij}^c were calculated using the Trimmed Mean of M-values (TMM) (Robinson and Oshlack, 2010). We used the EdgeR Bioconductor package with a matrix of offsets $[\kappa_{ijg}]$ to fit a negative binomial model per gene with a genewise dispersion as calculated in (Chen et al., 2014; McCarthy et al., 2012). The normalization as pointed out in (Dillies et al., 2013) has an important impact on all the downstream analyzes. The matrix of offsets was assumed to account for all normalization issues (here sequencing depth, numbers of polysome gradients and cytoplasmic values). We computed GLM likelihood ratio tests for UnF vs UnFpuro differences, F vs Fpuro differences and F vs UnF differences within female, to select respectively for mRNAs translated in unfertilized eggs, in fertilized eggs and for mRNAs which translation is modified by fertilization.

Raw p-values were adjusted for multiple comparisons by the Benjamini-Hochberg procedure (Benjamini and Hochberg, 1995) which controls the false discovery rate. Genes with an adjusted p-value lower than 0.05 were considered significant. All statistical analyses were performed using the R software (R Development Core Team, 2011) with Bioconductor (Gentleman et al., 2004) packages.

RT-PCR analysis

PCR primer pairs were designed from the component sequences of the *de novo* maternal transcriptome using web interface Primer3 (v. 0.4.0), and synthesized by Eurogentec

(sequences available in **Table. S2**). The primer pairs were chosen within the ORF and amplicons were between 70 and 250 bp long. All primer pairs were tested for amplification efficiency by standard curves using 5 points of 2-fold range dilution of reverse transcription reaction using cytoplasmic RNA. Only primers with amplification efficiency above 95% were retained for further analyses. Reverse transcription (RT) was performed using the reverse transcriptase SuperScript II (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The RTs were done using an equal volume of RNAs from each fraction. Semi-quantitative RT-PCR (sqRT-PCR) was done using a cDNA dilution within the linear range of amplification for each primer pair for 30 cycles. cDNAs were diluted in RNase-free water (1:300). Gene amplifications were done using the GoTaq Flexi kit (Promega) and 5 μ M primers. PCR were carried out as follows: 95°C for 2min; 30 cycles (95°C for 30s, 60°C for 30s, 72°C for 1min); 72°C for 5min. PCR products were analyzed on 2% agarose/TBE gels labeled with SybrSafe DNA stain (Invitrogen) and scanned on a Typhoon Trio (GE Healthcare Life Sciences). Quantification was done using ImageJ software.

The relative amounts of each mRNAs in polysomal pool (fractions 18-21) and in cytoplasmic samples in unfertilized eggs and one-hour embryos were determined by quantitative RT-PCR (qRT-PCR), on the same 3 biological replicates as the ones used for the RNA-Seq analysis, and were run in 3 experimental replicates. qRT-PCR reactions were performed in 5 μ l containing 2.1 μ l of cDNA (1/300); 0.4 μ l of a [10 μ M] primers solution containing forward and reverse primers; and 2.5 μ l of SYBR Green I Master Mix (Roche). Thermal cycling parameters were 95°C for 15min and 55 cycles (95°C for 10sec, 60°C for 30sec) followed by a denaturation step to verify the amplification of a single product. Data were analyzed with the LightCycler480 software. The metallothionein 1 (MT1) transcript was chosen as reference. The recruitment ratio ($\text{polysomal}_F/\text{cytoplasmic}_F$)/($\text{polysomal}_{UnF}/\text{cytoplasmic}_{UnF}$) was calculated for each mRNA as the average of three biological replicates, and expressed as a \log_2 FC for comparison with RNA-Seq data.

Results

Fertilization induces polysomal recruitment of cyclin B and ribonucleotide reductase small subunit mRNAs, but not of eIF4A mRNA

Unfertilized eggs are arrested in a G1-like stage of the cell cycle, having resumed meiotic maturation. Protein synthesis activity is low. Fertilization induces an increase in protein synthesis, as measured by incorporation of labeled methionine into protein, and the first cell division occurs as early as 70 minutes (**Fig. 1A**). Neosynthesized proteins increased shortly after fertilization, but the profile observed by SDS-PAGE did not vary dramatically (**Fig. 1B**), as noted by others in different sea urchin species (Brandhorst, 1976; Winkler et al., 1985). We addressed the question of the identification of these neo-synthesized proteins by using polysome profiling, which allows the separation of an mRNA according to its translational status. Polysome profile between unfertilized eggs and 1-hour post-fertilization eggs showed little difference, and no significant changes in heavy fractions of the gradient were detected (Chassé et al., 2015, submitted [Article 1]). Therefore, to assess the quality of our polysome preparation, we tested the polysomal recruitment of maternal mRNAs known to be translated after fertilization, such as cyclin B and the small subunit of ribonucleotide reductase (R2) mRNAs (Kelso-Winemiller et al., 1993; Standart et al., 1985), using semi-quantitative reverse transcription PCR (sqRT-PCR) on polysome gradients from unfertilized and fertilized eggs. In unfertilized eggs, both mRNAs were associated to top fractions (1-7) of the polysome gradient. Fertilization induced a strong association of cyclin B and R2 mRNAs with heavy polysomes fractions (18-21). In contrast, eIF4A mRNA repartition on polysome gradient was not strikingly modified after fertilization (**Fig. 1C**). Untranslated mRNAs in large RNA-protein complexes (mRNPs) might co-migrate with polysomal mRNAs on a sucrose gradient (Kelso-Winemiller and Winkler, 1991). Therefore, to distinguish between translated mRNAs and comigrating mRNPs, a control gradient was done in the presence of puromycin, a polysome disrupter. The antibiotic puromycin is incorporated into and disrupt only elongating polysomes (Alexandraki and Ruderman, 1985; Blobel and Sabatini, 1971). We therefore systematically compared the polysome profile with or without puromycin to take eventual mRNP contaminant into account. As shown in **Fig. 1C**, the pool of the cyclin B and R2 mRNAs associated to polysomal fractions in fertilized embryos was shifted towards lighter fractions upon puromycin treatment, indicating that these mRNAs were efficiently translated after fertilization. Those preliminary experiments allowed us to select fractions for subsequent RNA sequencing. We focused on the heavy polysome fractions of sucrose

gradient in order to identify new maternal mRNAs strongly recruited into polysomes after fertilization, with a recruitment behavior similar to cyclin B and ribonucleotide reductase small subunit mRNAs.

***De novo* assembly of a maternal reference transcriptome**

The cytoplasmic RNAs obtained from unfertilized eggs and fertilized embryos were sequenced and showed a good correlation between the three independent biological replicates (Pearson correlation R^2 above 0.80; **Supplementary Fig. S1**). As good genomic data for the European sea urchin was not currently available, RNA-Seq data was *de novo* assembled using the Trinity suite to generate a maternal reference transcriptome. The assembly generated 164256 transcripts, corresponding to 76110 genes. Only transcripts with a FPKM>5 were considered for the subsequent analysis, reducing the dataset to 43823 transcripts. Differential comparison between unfertilized and fertilized eggs showed no significant differences (**Suppl. Fig. S2**), suggesting that there was no variation in the abundance of the transcripts between unfertilized eggs and 1-hour embryos. An estimation of the repertoire of transcripts present in the maternal transcriptome was done in comparison with data available in the American sea urchin, for which a genome is available (Cameron et al., 2009; Sodergren et al., 2006). An annotation against the 23 000 gene predictions of the *S. purpuratus* genome assigned a best blastn hit with an e-value<10⁻⁵ to 14002 transcripts, corresponding to 7685 Trinity's uniques genes and to 6518 *S. purpuratus* gene prediction. The maternal transcriptome thus represented a rough estimate of 28% of total gene number, which is in the range of other species (20-45% in mouse, 55% in drosophila; Horner and Wolfner, 2008).

To estimate the most represented functions in the maternal transcriptome, we used a functional classification combining the terms associated to the corresponding *S. purpuratus* sea urchin genes (Cameron et al., 2009; Tu et al., 2012) with GOterms retrieved from the Trinotate annotation of the maternal transcriptome. The functions associated to transport (GO:0006810), metabolic processes (GO:0044281; GO:0006259; GO:0009058), cellular protein modification process (GO:0006464) and signal transduction (GO:0007165) were the most represented (**Suppl. Fig. S3**). Maternal mRNAs are present from fertilization throughout rapid cleavage stages, and start to decrease around 8-10 hours post-fertilization (Swartz et al., 2014) while zygotic transcripts start to be activated around 4-5 hours (Gildor and Ben-Tabou de-Leon, 2015). Although many studies focus on the analysis of the transcribed mRNAs, no data is currently available on the translationally active dataset of maternal mRNAs at fertilization, which should reflect the functional output of gene expression.

Translatome analysis

Polysome profiling reveals the translationally active fraction of an mRNA. Actively translated mRNAs are associated with multiple ribosomes (*i.e.* polysomes), whereas translationally quiescent mRNAs are sequestered within messenger ribonucleoparticles (mRNP) or associated with single ribosomes (monosomes). After mRNA fractionation through sucrose gradient, one can identify and selectively study the set of mRNAs being actively translated. To assess globally the translational changes that occurred at fertilization, heavy polysome-associated RNAs were prepared from unfertilized and 1-hour fertilized embryos and were quantified by mRNA sequencing. To confirm that the mRNAs that cosedimented with the polysomal fractions were actively engaged in translation, the heavy fractions associated RNAs prepared from eggs or embryos treated with puromycin *in vivo* were used for mRNA-sequencing quantification. The translatome pipeline is presented **Fig. 2A**. For the translatome analysis, the reads for 24 samples (see **Suppl. Table. S1**) were mapped independently against the filtered maternal transcriptome (14002 transcripts). The counts for polysome samples were corrected by the number of pooled gradients in order to compare the quantity obtained for each mRNA in equivalent number of eggs or embryos. A generalized linear model derived from EdgeR, on three independent biological replicates, was fitted to analyze the translation efficiency of each individual transcript, taking into account the cytoplasmic abundance of the transcript. A female effect was added in the model in order to consider the paired design.

Pair-wise comparison of the polysome fractions prepared with or without puromycin allowed to select translated mRNAs before and after fertilization. Genes with an adjusted pvalue lower than 0.05 and with a positive \log_2FC were considered biologically significant. The polysome data obtained from fertilized samples showed a good correlation between the three independent replicates (R^2 above 0.60; **Suppl. Fig. S1**), and no \log_2FC threshold was set. In contrast, we observed a lower correlation (R^2 above 0.40) between the three biological replicates of the unfertilized polysomes samples, the translation activity being lower in unfertilized eggs. Therefore a threshold for the unfertilized data was set at $\log_2FC > 1$, to insure that the biologically relevant transcripts were selected. We found that 52% of the transcripts maternally present (7319/14002) were never translated, whereas 18.8% (2637) of the transcripts were translated in unfertilized eggs, rising to 41.5% (5821) after fertilization. Among the translated transcripts, 12% (1775) were translated both before and after fertilization (**Fig. 2B**).

To select transcripts which translation is modified by fertilization, transcripts with significant differences (BH adjusted p-value <0.05) between unfertilized eggs and fertilized embryos were retained. Data were filtered for translated mRNAs (as selected above) to retrieve the transcripts which translation occurs only after fertilization ($\log_2FC (F/UnF) > 0$ and $\log_2FC (F/Fpuro) > 0$) or increases after fertilization ($\log_2FC (F/UnF) > 0$, $\log_2FC (F/Fpuro) > 0$ and $\log_2FC (UnF/UnFpuro) > 1$). We found that 2514 transcripts (17.9%) were significantly recruited at fertilization. Among those, a majority (2195/2514; 87%) was translated *de novo*; only 319 transcripts were translated before and after fertilization. 1351 transcripts (9.6%) were found significantly released of polysomes at fertilization (**Fig. 2C**).

Interestingly, we noticed that a proportion of transcripts (1851/14002; 13%) showed no significant differences between unfertilized and fertilized polysomes but were efficiently translated after fertilization ($\log_2FC (F/Fpuro) > 0$, $p < 0.05$); these transcripts probably corresponded to mRNAs stored in heavy mRNPs or stalled polysomes in unfertilized eggs, and that were activated for translation after fertilization (**Fig. 2C**, “recruitment masked by mRNPs”). In contrast, transcripts showing a significant difference between fertilized and unfertilized polysomes without being actively translated corresponded to the ones entering into or leaving heavy mRNPs co-migrating with polysomes upon fertilization. These data strongly suggest that corrections with puromycin-treated data are determinant to identify actively translated mRNAs (**Suppl. Fig. S4**).

It was suggested that fertilization triggering the activation of the translation machinery would lead to translation of all mRNAs according to the bulk amount in the maternal stock (Brandhorst, 1976). Our translatoome analysis showed that only a fraction of the maternal mRNAs entered polysomes at fertilization. We then asked whether there was a bias towards abundant mRNAs. Comparing mRNAs abundance with their corresponding recruitment index ($\log_2FC(F/UnF)$) showed no correlation between these two parameters, and the mean FPKM value of recruited mRNAs was similar to the value obtained for the maternal mRNAs (**Suppl. Fig. S5**). We further analyzed abundant maternal transcripts with a FPKM > 500 from the RNAseq data and checked for their translational status. As expected, cyclin B, cyclin A and the small subunit of ribonucleotide reductase were among the most abundant maternal mRNAs (Kelso-Winemiller et al., 1993; Standart et al., 1985) and were strongly translated after fertilization. Other abundant mRNAs were identified in this study as translated after fertilization (*e.g.* SoxB1, RKHD). On the contrary, other abundant mRNAs (*e.g.* MT1) were not recruited into polysomes after fertilization, as judged by the non-significant \log_2 -fold change between unfertilized eggs and fertilized embryos, and/or the fact that puromycin did

not impact the polysome profile, indicating that these mRNAs were not associated to active polysomes. Interestingly, the cleavage histone mRNAs detected in the maternal transcriptome were not translated in our analysis, in agreement with previous data showing that histone H3 mRNA moves into polysomes only after first cleavage division (Wells et al., 1981). Among the 42 most abundant transcripts (FPKM>500), only 9 of them were significantly recruited into polysomes after fertilization (**Suppl. Table. S3**). This is not statistically different from random representation in the translated set (binomial test $p<0.05$).

We focused our analysis on the 2514 transcripts that were significantly recruited at fertilization, in order to identify new biological actors strongly regulated at the oocyte-to-embryo transition. Table 1 presents a list of translated and recruited mRNAs. As expected, the mRNAs already identified by others such as cyclin A, cyclin B and the small subunit of ribonucleotide reductase (Kelso-Winemiller et al., 1993; Standart et al., 1985) were also identified by RNA-Seq analysis of polysomal mRNAs. Cyclin B mRNAs was ranked first when translated mRNAs were classified from lowest to highest pvalues, indicating a strong biological constraint on the translation of this mRNAs. Strikingly, many other mRNAs encoding for proteins in cell cycle regulation were found. The RNA binding proteins were also well represented in the top translated mRNAs. Functional classes in the translated mRNAs set were compared to the maternal set. We used a binomial test to compare the observed number of translated genes with the expected number for each functional class, assuming random representation of the maternal mRNAs in the translated set. We found that maternal transcripts implicated in cell cycle, oxydoreductase activity, mRNA processing, TGF- β signaling, and RNA-binding proteins were the most over-represented classes (binomial test, $pvalue<10^{-5}$) (**Fig. 3A**). Maternal mRNAs from each functional category (cell cycle, RNA-BP, signaling and ribosomal proteins) were further classified according to their translational change at fertilization (recruited, translated from mRNPs stocks, release from polysomes and unchanged). For cell cycle mRNAs and RNA-BP, half of the maternal mRNAs were in the translated categories. A striking feature of the TGF- β signaling was the abundance in the translated pools from mRNPs stores (**Fig. 3B**). The transcripts coding for the ribosomal proteins were significantly under-represented in the translated set of mRNAs, and were further shown to be untranslated (**Fig 3A and B**).

Using pooled polysomes RNAs from fractions 18 to 21 and cytoplasmic RNAs from three independent experiments in paired unfertilized and fertilized samples, a subset of 15 genes (translated and untranslated, high and low abundance) was analyzed by qRT-PCR (see primers **Table. S2**). Quantification for each mRNA was done relative to reference mRNA

encoding MT1 (metallothionein 1). Polysomal recruitment was then calculated as the ratio $(\text{polys}_F/\text{cyto}_F)/(\text{polys}_{UnF}/\text{cyto}_{UnF})$. The fold-change recruitment obtained by qRT-PCR of pooled polysomal fractions *versus* cytoplasmic was consistent with the recruitment fold-change found by RNA-Seq analysis (**Suppl. Fig. S6**).

To further analyze the proportion of each mRNA that enters polysomes after fertilization, we monitored the repartition of mRNAs identified in the translome on a sucrose gradient. We compared the repartition along the gradient in unfertilized eggs, 1 hour after fertilization, and in puromycin-treated fertilized embryos. All conditions for each biological replicate were obtained from sibling eggs and embryos of a single female and male pair and were processed in parallel. The repartitions for 13 mRNAs identified as recruited into polysomes at fertilization are shown in **Fig. 4**, in 5 biological replicates. We chose to test mRNAs ranging a wide spectrum of abundance and fold-change, in cell cycle, RNA-BP, translation regulators and maternal determinant categories. The polysome profile showed that in unfertilized eggs, the mRNAs were mainly present in the light fractions (3-7) of the gradient. Fertilization triggered a shift of the mRNAs towards the heavy fractions (17-21) of the gradient, displaced in puromycin-treated embryos, which demonstrated the recruitment of these mRNAs into polysome fractions. Therefore the translome analysis by RNA-Seq described above has been validated to uncover newly translated mRNAs. As negative controls, two mRNAs encoding respectively metallothionein 1 and ribosomal protein rps3, identified as untranslated following fertilization (see **Table. 1**) were also tested. The polysome profile showed no differences between fertilized and puromycin-treated fertilized samples, indicating that the MT1 and rps3 mRNAs were not translated.

Implication of the mTOR pathway in the polysomal recruitment

mTOR signaling pathway is implicated in the protein synthesis increase after fertilization in sea urchin. We have previously shown in *P. lividus* that incubation of embryos with PP242, an ATP-competitor mTOR inhibitor (Apsel et al., 2008; Benjamin et al., 2011), inhibits 4E-BP degradation and protein synthesis increase triggered by fertilization, and delays progression through cell cycle (Chassé et al, submitted, and **Suppl. Fig. S7**). We asked whether polysomal recruitment was impacted by mTOR inhibition, on selected mRNAs that we identified as recruited at fertilization (**Fig. 4**). Eggs were treated with PP242 mTOR inhibitor 10 minutes before fertilization, and we compared mRNA recruitment into polysomes in PP242-treated and untreated control embryos one hour post-fertilization, in 5 independent experiments. PP242-treated embryos were also incubated with puromycin before collection,

to quantify a possible residual translation. The mRNAs which translation we tested could be grouped into three categories regarding the inhibition of their translation in presence of PP242. The first one comprises mRNAs which fertilization-induced translation is completely inhibited by PP242 (Cyclin A, ribonucleotide reductase small subunit R2, CDC6, and RNA-binding protein Musashi). The polysome profile in presence of PP242 matched the one obtained with additional puromycin (**Fig. 5**, left panel). In the second group, a fraction of mRNAs remained present in the polysome fractions after PP242 treatment, and addition of puromycin dissociated the remaining polysomes, demonstrating that the fraction of the mRNAs present in polysomes were still translated despite mTOR inhibition and global protein synthesis inhibition (**Suppl. Fig. S7**). We confirmed that translation of Cyclin B mRNA was partially independent on mTOR pathway (as described in Chassé et al, submitted). In addition the mRNA encoding its kinase partner CDK1 also exhibited the same translation pattern, as well as eIF4B and RNA-binding protein RBM4 (**Fig. 5**, right panel). Interestingly, we showed the existence of mRNAs which translation completely escaped the inhibition of cap-dependent translation by PP242 mTOR inhibition (**Fig. 6**): DAP5, CUGBP, RKHD, Cdt1, Geminin, SoxB1 and Gustavus.

We next asked whether the residual translation in presence of mTOR inhibitor could be regulated by another signaling pathway. The mTOR pathway inhibition can lead to a hyperactivation of the MAPK pathway in mammalian cells (Carracedo et al., 2008), both pathways are connected by compensatory feedback loops (reviewed in Mendoza et al., 2011) that are efficiently blocked by dual inhibition (Renshaw et al., 2013). PP242 has been identified as an ERK activator in multiple myeloma cells (Hoang et al., 2012). These data prompted us to ask whether a similar relay could take place in sea urchin. Phosphorylated MAPK is present in sea urchin unfertilized eggs, and fertilization triggers its dephosphorylation (Zhang et al., 2005). In order to test the hypothesis of a potential re-activation of the MAPK pathway induced by the mTOR inhibition, fertilized embryos were treated with the inhibitor U0126, which inhibits MAPK activation (Hoang et al., 2012). U0126 [60µM] delayed the onset of the first cell cycle but moderately impacted global translation activity (**Suppl. Fig. S7B-C**). Eggs were first treated with PP242 inhibitor 10 minutes before fertilization, to fully inhibit 4E-BP degradation, then U0126 was added 5 minutes after fertilization to prevent from a possible reactivation of MAPK pathway in response to mTOR inhibition, both inhibitors were kept in contact with the embryos throughout the experiment. Repartition of eleven mRNAs exhibiting a residual translation

(**Fig. 5**, left panel and **Fig. 6**) was analyzed on polysome gradients in three independent experiments. In embryos exposed to U0126 only, no significant variation in polysomal recruitment after fertilization was observed (**Suppl. Fig. S8**). However, we were able to unambiguously determine the MAPK contribution to the residual translation for five out of the eleven mRNAs tested. The other mRNAs exhibited an inter-individual variability of the response to the drugs higher than the variability between PP242 and PP242+U0126 treatments. Figure 7 compares the repartition of mRNAs in fertilized embryos treated with PP242, with PP242+U0126 and with puromycin treatment. Puromycin, alone or in combination to inhibitors, consistently removed all mRNAs associated to polysomes (**Suppl. Fig. S9**). eIF4B mRNA, which partly remained in polysomes in PP242-treated embryos (**Fig. 5**), and Cdt1, RKHD, SoxB1 mRNAs, which translation was independent of mTOR activity (**Fig. 6**), were completely released off polysomal fractions when both PP242 and U0126 were present (**Fig. 7**), suggesting that MAPK activity is involved in their translation. In contrast, DAP5 mRNA, which translation was independent of mTOR activity, remained partly present in polysome fractions (**Fig. 7**), suggesting the implication of an additional mechanism, yet undetermined.

Discussion

Protein synthesis changes at fertilization relies on maternal mRNA use only

No difference in the transcript repertoire was found between eggs and embryos following fertilization, showing that no new transcripts were produced during this short time frame. Although histone mRNAs transcription (Brandhorst, 1980) were shown to occur rapidly at fertilization, these mRNAs were not selected and therefore do not appear in our study because RNA-Seq libraries were made after poly(A) selection. The observed protein synthesis increase at fertilization therefore relies only on the translation of stored maternal mRNAs.

Translation of a subset of maternal mRNAs at fertilization

Fertilization triggers a large increase in protein synthesis due to the activation of cap-dependent translation machinery. To date, only quantitative changes have been reported, because most proteins detected after fertilization were already present in the egg (Brandhorst, 1976). Nonetheless, some reports described new proteins synthesized soon after fertilization, among which are the cyclins driving the cell cycle (Evans et al., 1983; Kelso-Winemiller and

Winkler, 1991). To re-examine the question of the qualitative translational changes occurring at fertilization, we coupled polysome sucrose gradient technique to isolate translated mRNAs with RNA-sequencing technology, allowing a large-scale translome analysis. In this study we have analyzed the set of mRNAs that were recruited one hour post-fertilization, in the 1-cell embryo before the occurrence of first cell division. We therefore focused on the oocyte-to-embryo transition, a key developmental stage going from a differentiated oocyte into a totipotent embryo (Horner and Wolfner, 2008). We also focused our analysis on the mRNAs that entered the heavy polysomal fractions, in other words, that were very efficiently translated. For the first time in sea urchin, we showed that a limited subset (20%) of the maternal stored mRNAs was efficiently translated, whereas the majority (80%) was not translated at this early time-point after fertilization. Interestingly, some mRNAs (2%) strongly recruited at fertilization were also translated before fertilization, albeit at a lower rate, suggesting the existence of a cap-independent mechanism of translation before fertilization. We also found mRNAs that were translated only before fertilization, and mRNAs for which ongoing translation did not change at fertilization, they were beyond the scope of this study but would need further study. The contribution of maternal mRNAs unmasking from mRNPs has been underlined in this study by the fact that the translation of some mRNAs was only revealed by comparison to puromycin-treated embryos. 13% of the maternal mRNAs were found to display such compartment changes. Our study thus demonstrated the selective recruitment of a subset of stored maternal mRNAs at fertilization, in a invertebrate deuterostome, the sea urchin

Translated maternal mRNAs at fertilization are involved in several biological processes

The translated maternal mRNAs at fertilization were enriched in several biological processes, involved in sea urchin early development. It is noteworthy that functional classes were also enriched in sea urchin fertilization, as shown in mouse oocyte maturation and fertilization (Chen et al., 2011), or in drosophila egg activation (Kronja et al., 2014); but functional classes may be different according to whether the egg has to complete meiosis or the timing of zygotic re-activation.

Cell cycle regulators

The mRNAs encoding cell cycle regulators were enriched in the maternal set of translated mRNAs. It is well established that accumulation of some key components of the

cell cycle, such as the cyclins, are regulated at the level of translation oocytes and early embryos, as well as in somatic cells (Tarn and Lai, 2011). In addition to the already described cyclin A and B mRNAs, we surprisingly found the mRNAs encoding their partner CDK1 in the maternal set of translated mRNAs. This is the first demonstration of a translational regulation of CDK1 in animals. The CDK1 protein is present as an abundant maternal protein and its level is not modified by protein synthesis inhibition (Meijer et al., 1991). The amount of neosynthesized CDK1 resulting from the mRNA entry into polysome may be negligible compared to the maternal amount, as already observed for other proteins in different organisms (Kronja et al., 2014), but the small amount of unphosphorylated neosynthesized CDK1 associated to Cyclin B could have a role in the auto-amplification loop of the complex. Furthermore, we found that a large number of cell cycle regulators are translationally activated, giving an additional layer of complexity in the regulation of cell cycle progression. Three mRNAs encoding proteins of the pre-replication complex (Cdt1, CDC6 and Geminin) were equally recruited in polysomes 1 hour after fertilization. Geminin protein accumulated at 30 minutes post-fertilization, whereas Cdt1 and CDC6 did not in sea urchin (Aze et al., 2010). This apparent discrepancy may be explained by the small proportion of the neosynthesized proteins compared to large amount of maternal proteins, leading to apparent unchanged steady state level. It is noteworthy that the three mRNAs were not impacted equally by mTOR inhibition.

Maternal determinants of development patterning

Axis specification and endomesoderm formation rely on determinants which mRNAs are expressed maternally in sea urchin. Among these maternal determinants, SoxB1 mRNA was strongly recruited and translated in one-cell embryo, very early with respect to its role in transcription reactivation at early blastula. This early translation is in agreement with data shown in *S. purpuratus*, where the SpSoxB1 protein was first detected by western blot after the 2-cell stage and increases in abundance during cleavage stages (Kenny et al., 1999). Other mRNAs acting in the same gene regulatory network were not recruited into polysomes at fertilization (for example Otx or Ets1/2), suggesting that SoxB1 may have an additional role in early cleavage stages. Interestingly, work from A. Giraldez's group in zebrafish showed recently that SoxB1 was one of the most strongly and early translated maternal mRNAs and was implicated in maternal mRNAs clearance, by regulating the transcription of microRNA mir-430 (Lee et al., 2013).

During sea urchin germ line development, the E3 ubiquitin ligase specificity receptor Gustavus regulates the accumulation of Vasa protein in small micromeres, and the protein accumulates in the embryo between egg and 4-cells stage (Gustafson et al., 2011). This increase in protein level can be explained by the strong polysomal recruitment of the Gustavus mRNA that we have detected after fertilization in our study.

In sea urchin, the establishment of the oral-aboral axis is highly regulated by the spatially localized zygotic expression of Nodal, which depends on maternal factors implicated in the TGF- β signaling (Haillot et al., 2015; Range and Lepage, 2011). Several members of the TGF- β pathway such as the activin receptor-like kinase receptor ALK2, Vg1/univin and SMAD4 were present among the maternal mRNAs strongly recruited at fertilization. Interestingly, other mRNAs from TGF- β pathway were mostly enriched in the fraction of maternal mRNAs that were in mRNPs or stalled polysomes before fertilization, since their recruitment into polysomes was only revealed by the comparison with puromycin-treated eggs and embryos.

RNA-binding proteins

We observed an enrichment of mRNA encoding RNA-binding proteins in the translated set of maternal mRNAs. RNA-binding protein RBM4 was found in the top five mRNAs recruited at fertilization ($\log_2FC > 3$; $pvalue < 10^{-5}$; **Table 1**). RBM4 is involved in specific translation in hypoxia (Uniacke et al., 2012), and in IRES (*Internal Ribosome Entry Site*)-dependent translation in stress condition in mammalian cells (Lin and Tarn, 2009). The drosophila RBM4 homolog, LARK is required for development (McNeil et al., 1999). Several of the translated RNA-binding proteins are involved in translation repression of specific mRNAs. For example, CUGBP is an RRM-domain containing RNA-binding protein first identified in *Xenopus* embryo for its ability to bind specifically to a GU-rich element (Embryonic deadenylation element EDEN) located in the 3'UTRs of some mRNAs that are rapidly deadenylated and translationally repressed after fertilization in early development (Paillard et al., 1998). RKHD is a KH- and ring-domain containing RNA-binding protein identified in worm, ascidians and sea urchin genomes, with four paralogs in vertebrates (MEX3A-D), MEX3B being the closest to the invertebrate homologs. MEX3 has been shown to be a translation repressor, involved in embryonic cell fate (reviewed in Pereira et al., 2013). In sea urchin RKHD has been identified as a ubiquitous maternal and localized zygotic mRNA (Röttinger et al., 2006), its function in sea urchin has not been investigated yet. CUGBP and RKHD were strongly recruited into polysomes after fertilization. These two

mRNAs were translated in some individuals also before fertilization. Interestingly, they were translated in PP242-treated embryos. In both condition, the translation inhibitor protein 4E-BP was present and inhibited cap-dependent translation, suggesting an alternative translation initiation for CUGBP and RKHD mRNAs. No data is available concerning the maternal presence of the proteins encoded by these mRNAs, but finding that they were neosynthesized after fertilization suggests that control of mRNA fate (stability, localization, translation, *etc.*) could be set-up or modified in the early embryo.

Identification of mTOR independent translation in sea urchin translated mRNAs

In this study we have shown that impairing the mTOR pathway activated at fertilization did not impact similarly all mRNAs. When embryos are treated with PP242 or rapamycin, the global protein synthesis is inhibited, but there are proteins that are still neosynthesized ((Salaün et al., 2003), **Fig. S7**). For the first time, we have identified mRNAs which translation is independent of mTOR translation in sea urchin. On the survey of 16 mRNAs we found surprising that a high number of mRNAs (44%) is still translated in PP242-treated embryos. It was shown that 3-5% of mRNAs remained associated to polysomes in somatic cells when cap-dependent translation was impaired (Johannes et al., 1999). This discrepancy could be due to the nature of the mRNAs tested, which encode for proteins involved in highly regulated processes, or to the embryo status compared to somatic cells. A first clue may be that mRNAs encoding ribosomal proteins were not translated in fertilized sea urchin embryos, whereas activation of the mTOR pathway in mammalian cells increases their translation (Fonseca et al., 2014). A translome analysis of PP242-treated embryos will help apprehend the full spectrum of residual translation when cap-dependent translation is impaired. Our study also demonstrate the conservation in sea urchin of the mTOR and MAPK pathway relay for the translation of specific mRNAs, as previously described in mammalian cells (Carracedo et al., 2008; Hoang et al., 2012; Renshaw et al., 2013).

We have shown for the first time in sea urchin that several mRNAs are translated in PP242-treated embryos, potentially in an IRES-dependent mechanism. These mRNAs encode for DAP5, CUGBP, RKHD, Cdt1, Geminin, SoxB1 and Gustavus, and can now be used to uncover the *cis*- and *trans*- regulatory mechanisms responsible for their specific translation regarding the mTOR pathway. Among these mRNAs, DAP5 (an eIF4G homolog unable to bind eIF4E) is translated through an IRES located in its 5'UTR in mammalian cells (Henis-Korenblit et al., 2000), suggesting an evolutionary conservation among deuterostomes.

Sequences databases

RNA-Seq raw data have been deposited in NCBI BioProject database under the accession PRJNA288758.

Additional files

The complete list of maternal and translated mRNAs can be found in the supplementary excel file.

References

- Alexandraki, D. and Ruderman, J. V.** (1985). Expression of α - and β -tubulin genes during development of sea urchin embryos. *Dev. Biol.* **109**, 436–451.
- Anders, S. and Huber, W.** (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* **11**, R106.
- Apsel, B., Blair, J. A., Gonzalez, B., Nazif, T. M., Feldman, M. E., Aizenstein, B., Hoffman, R., Williams, R. L., Shokat, K. M. and Knight, Z. A.** (2008). Targeted polypharmacology: discovery of dual inhibitors of tyrosine and phosphoinositide kinases. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 691–699.
- Aze, A., Fayet, C., Lapasset, L. and Genevière, A. M.** (2010). Replication origins are already licensed in G1 arrested unfertilized sea urchin eggs. *Dev. Biol.* **340**, 557–570.
- Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C. and Hall, M. N.** (2011). Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 868–880.
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y.** (1995). Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* **57**, 289–300.
- Blobel, G. and Sabatini, D.** (1971). Dissociation of mammalian polyribosomes into subunits by puromycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 390–394.
- Brandhorst, B. P.** (1976). Two-dimensional gel patterns of protein synthesis before and after fertilization of sea urchin eggs. *Dev. Biol.* **52**, 310–317.
- Brandhorst, B. P.** (1980). Simultaneous synthesis, translation, and storage of mRNA including histone mRNA in sea urchin eggs. *Dev. Biol.* **79**, 139–148.
- Cameron, R. A., Samanta, M., Yuan, A., He, D. and Davidson, E.** (2009). SpBase: The sea urchin genome database and web site. *Nucleic Acids Res.* **37**, 750–754.
- Carracedo, A., Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Rojo, F., Salmena, L., Alimonti, A., Egia, A., Sasaki, A. T., Thomas, G., Kozma, S. C., et al.** (2008). Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J. Clin. Invest.* **118**, 3065–3074.
- Chen, J., Melton, C., Suh, N., Oh, J. S., Horner, K., Xie, F., Sette, C., Blelloch, R. and Conti, M.** (2011). Genome-wide analysis of translation reveals a critical role for deleted in azoospermia-like (Dazl) at the oocyte-to-zygote transition. *Genes Dev.* **25**, 755–766.
- Chen, Y., Lund, A. H. and Smyth, G. K.** (2014). Differential expression analysis of complex RNA-Seq experiments using edgeR. In *Statistical Analysis of Next Generation Sequence Data* (ed. Datta, S. and Nettleton, D.), New York: Springer.

- Cormier, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Sonenberg, N. and Bellé, R.** (2001). eIF4E Association with 4E-BP Decreases Rapidly Following Fertilization in Sea Urchin. *Dev. Biol.* **232**, 275–283.
- Costache, V., Bilotto, S., Laguerre, L., Bellé, R., Cosson, B., Cormier, P. and Morales, J.** (2012). Dephosphorylation of eIF2 α is essential for protein synthesis increase and cell cycle progression after sea urchin fertilization. *Dev. Biol.* **365**, 303–309.
- Dillies, M.-A., Rau, A., Aubert, J., Hennequet-Antier, C., Jeanmougin, M., Servant, N., Keime, C., Marot, G., Castel, D., Estelle, J., et al.** (2013). A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. *Brief. Bioinform.* **14**, 671–683.
- Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D. and Hunt, T.** (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**, 389–396.
- Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., et al.** (2014). Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res.* **42**, D222–30.
- Fonseca, B. D., Smith, E. M., Yelle, N., Alain, T., Bushell, M. and Pause, A.** (2014). The ever-evolving role of mTOR in translation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 1–12.
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., et al.** (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* **5**, R80.
- Gildor, T. and Ben-Tabou de-Leon, S.** (2015). Comparative Study of Regulatory Circuits in Two Sea Urchin Species Reveals Tight Control of Timing and High Conservation of Expression Dynamics. *PLOS Genet.* **11**, e1005435.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., et al.** (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* **29**, 644–652.
- Gustafson, E. A., Yajima, M., Juliano, C. E. and Wessel, G. M.** (2011). Post-translational regulation by gustavus contributes to selective Vasa protein accumulation in multipotent cells during embryogenesis. *Dev Biol* **349**, 440–450.
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., et al.** (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.* **8**, 1494–1512.

- Haillot, E., Molina, M. D., Lapraz, F. and Lepage, T.** (2015). The Maternal Maverick/GDF15-like TGF- β Ligand Panda Directs Dorsal-Ventral Axis Formation by Restricting Nodal Expression in the Sea Urchin Embryo. *PLOS Biol.* **13**, e1002247.
- Henis-Korenblit, S., Strumpf, N. L., Goldstaub, D. and Kimchi, A.** (2000). A novel form of DAP5 protein accumulates in apoptotic cells as a result of caspase cleavage and internal ribosome entry site-mediated translation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 496–506.
- Hershey, J. W. B., Sonenberg, N. and Mathews, M. B.** (2012). Principles of Translational Control: An Overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a011528–a011528.
- Hoang, B., Benavides, A., Shi, Y., Yang, Y., Frost, P., Gera, J. and Lichtenstein, A.** (2012). The PP242 Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibitor Activates Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) in Multiple Myeloma Cells via a Target of Rapamycin Complex 1 (TORC1)/ Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (eIF-4E)/RAF Pathway and Acti. *J. Biol. Chem.* **287**, 21796–21805.
- Horner, V. L. and Wolfner, M. F.** (2008). Transitioning from egg to embryo: Triggers and mechanisms of egg activation. *Dev. Dyn.* **237**, 527–544.
- Johannes, G., Carter, M. S., Eisen, M. B., Brown, P. O. and Sarnow, P.** (1999). Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13118–13123.
- Kelso-Winemiller, L. C. and Winkler, M. M.** (1991). “Unmasking” of stored maternal mRNAs and the activation of protein synthesis at fertilization in sea urchins. *Development* **111**, 623–633.
- Kelso-Winemiller, L., Yoon, J., Peeler, M. T. and Winkler, M. M.** (1993). Sea urchin maternal mRNA classes with distinct development regulation. *Dev. Genet.* **14**, 397–406.
- Kenny, A. P., Kozlowski, D., Oleksyn, D. W., Angerer, L. M. and Angerer, R. C.** (1999). SpSoxB1, a maternally encoded transcription factor asymmetrically distributed among early sea urchin blastomeres. *Development* **126**, 5473–5483.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E. L. .** (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**, 567–580.
- Kronja, I., Yuan, B., Eichhorn, S. W., Dzeyk, K., Krijgsveld, J., Bartel, D. P. and Orr-Weaver, T. L.** (2014). Widespread Changes in the Posttranscriptional Landscape at the Drosophila Oocyte-to-Embryo Transition. *Cell Rep.* **7**, 1495–1508.
- Kuersten, S., Radek, A., Vogel, C. and Penalva, L. O. F.** (2013). Translation regulation gets its “omics” moment. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **4**, 617–630.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. and Salzberg, S. L.** (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* **10**, R25.

- Larsson, O., Tian, B. and Sonenberg, N.** (2013). Toward a genome-wide landscape of translational control. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a012302.
- Le Breton, M., Bellé, R., Cormier, P., Mulner-Lorillon, O. and Morales, J.** (2003). M-phase regulation of the recruitment of mRNAs onto polysomes using the CDK1/cyclin B inhibitor aminopurvalanol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 880–886.
- Lee, M. T., Bonneau, A. R., Takacs, C. M., Bazzini, A. A., DiVito, K. R., Fleming, E. S. and Giraldez, A. J.** (2013). Nanog, Pou5f1 and SoxB1 activate zygotic gene expression during the maternal-to-zygotic transition. *Nature* **503**, 360–364.
- Lin, J. C. and Tarn, W. Y.** (2009). RNA-binding motif Protein 4 translocates to cytoplasmic granules and suppresses translation via argonaute2 during muscle cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **284**, 34658–34665.
- McCarthy, D. J., Chen, Y. and Smyth, G. K.** (2012). Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4288–4297.
- McNeil, G. P., Zhang, X., Roberts, M. and Jackson, F. R.** (1999). Maternal function of a retroviral-type zinc-finger protein is essential for Drosophila development. *Dev. Genet.* **25**, 387–396.
- Meijer, L., Azzi, L. and Wang, J. Y.** (1991). Cyclin B targets p34cdc2 for tyrosine phosphorylation. *Embo J* **10**, 1545–1554.
- Mendoza, M. C., Er, E. E. and Blenis, J.** (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 320–328.
- Oulhen, N., Salaün, P., Cosson, B., Cormier, P. and Morales, J.** (2007). After fertilization of sea urchin eggs, eIF4G is post-translationally modified and associated with the cap-binding protein eIF4E. *J. Cell Sci.* **120**, 425–434.
- Oulhen, N., Mulner-Lorillon, O. and Cormier, P.** (2010). eIF4E-binding proteins are differentially modified after ammonia versus intracellular calcium activation of sea urchin unfertilized eggs. *Mol. Reprod. Dev.* **77**, 83–91.
- Paillard, L., Omilli, F., Legagneux, V., Bassez, T., Maniey, D. and Osborne, H. B.** (1998). EDEN and EDEN-BP, a cis element and an associated factor that mediate sequence-specific mRNA deadenylation in Xenopus embryos. *EMBO J.* **17**, 278–287.
- Pereira, B., Le Borgne, M., Chartier, N. T., Billaud, M. and Almeida, R.** (2013). MEX-3 proteins: recent insights on novel post-transcriptional regulators. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 477–479.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. and Nielsen, H.** (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* **8**, 785–786.
- R Development Core Team** (2011). *R: A language and environment for statistical computing.*

- Range, R. and Lepage, T.** (2011). Maternal Oct1/2 is required for Nodal and Vg1/Univin expression during dorsal–ventral axis specification in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* **357**, 440–449.
- Renshaw, J., Taylor, K. R., Bishop, R., Valenti, M., De Haven Brandon, A., Gowan, S., Eccles, S. A., Ruddle, R. R., Johnson, L. D., Raynaud, F. I., et al.** (2013). Dual Blockade of the PI3K/AKT/mTOR (AZD8055) and RAS/MEK/ERK (AZD6244) Pathways Synergistically Inhibits Rhabdomyosarcoma Cell Growth In Vitro and In Vivo. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5940–5951.
- Robinson, M. D. and Oshlack, A.** (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* **11**, R25.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J. and Smyth, G. K.** (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–40.
- Röttinger, E., Besnardeau, L. and Lepage, T.** (2006). Expression pattern of three putative RNA-binding proteins during early development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Gene Expr. Patterns* **6**, 864–872.
- Salaun, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Bellé, R., Sonenberg, N. and Cormier, P.** (2003). eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* **255**, 428–439.
- Salaün, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Bellé, R., Sonenberg, N. and Cormier, P.** (2003). eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* **255**, 428–439.
- Schmieder, R., Lim, Y. W. and Edwards, R.** (2012). Identification and removal of ribosomal RNA sequences from metatranscriptomes. *Bioinformatics* **28**, 433–435.
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W. and Selbach, M.** (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337–342.
- Sodergren, E., Weinstock, G., Davidson, E. H., Cameron, R. A., Gibbs, R. A., Angerer, R. C. and Angerer, L. M.** (2006). The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*. **314**, 941–952.
- Standart, N. M., Bray, S. J., George, E. L., Hunt, T. and Ruderman, J. V** (1985). The small subunit of ribonucleotide reductase is encoded by one of the most abundant translationally regulated maternal RNAs in clam and sea urchin eggs. *J Cell Biol* **100**, 1968–1976.
- Swartz, S. Z., Reich, A. M., Oulhen, N., Raz, T., Milos, P. M., Campanale, J. P., Hamdoun, A. and Wessel, G. M.** (2014). Deadenylase depletion protects inherited mRNAs in primordial germ cells. *Development* **141**, 3134–3142.
- Tarn, W.-Y. and Lai, M.-C.** (2011). Translational control of cyclins. *Cell Div.* **6**, 5.

- Tu, Q., Cameron, R. A., Worley, K. C., Gibbs, R. A. and Davidson, E. H.** (2012). Gene structure in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* based on transcriptome analysis. *Genome Res.* **22**, 2079–2087.
- Uniacke, J., Holterman, C. E., Lachance, G., Franovic, A., Jacob, M. D., Fabian, M. R., Payette, J., Holcik, M., Pause, A. and Lee, S.** (2012). An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery. *Nature* **486**, 126–130.
- Wells, D. E., Showman, R. M., Klein, W. H. and Raff, R. A.** (1981). Delayed recruitment of maternal mRNA in sea urchin embryos. *Nature(London)* **292**, 477–478.
- Winkler, M. M., Nelson, E. M., Lashbrook, C. and Hershey, J. W.** (1985). Multiple levels of regulation of protein synthesis at fertilization in sea urchin eggs. *Dev. Biol.* **107**, 290–300.
- Zhang, W. L., Huitorel, P., Glass, R., Fernandez-Serra, M., Arnone, M. I., Chiri, S., Picard, A. and Ciapa, B.** (2005). A MAPK pathway is involved in the control of mitosis after fertilization of the sea urchin egg. *Dev. Biol.* **282**, 192–206.

Figures and Tables Legends

Table. 1: Identification of recruited and translated mRNAs at fertilization by RNA-Seq analysis of polysomal mRNAs. Each mRNA was identified through a transcript ID corresponding to the Trinity *de novo* assembly of the maternal transcriptome, translation index ($\log_2FC(F/F_{puro})$) and entry into polysomes fractions ($\log_2FC(F/UnF)$) after fertilization are indicated with their respective adjusted pvalues. Abundance expressed as FPKM and best blast hit to *S. purpuratus* gene models (Echinobase; <http://echinobase.org>; Cameron et al, 2009) are indicated. In bold are shown the mRNAs which have been further verified by polysome gradient repartition in **Fig. 4**.

Figure. 1: **A-** Cell division and [^{35}S]-methionine incorporation into proteins after fertilization. The data is the mean of two independent experiments, error bars represent standard deviation. **B–** Profile of [^{35}S]-methionine labeled neo-synthesized proteins separated on SDS-PAGE gel. **C-** Cyclin B (CycB), ribonucleotide reductase small subunit (R2) and initiation factor 4A (eIF4A) mRNAs repartition along 15-40% sucrose gradient before (UnF) and after (F) fertilization. mRNA was quantified by semi quantitative RT-PCR in each fraction, and represented as a percent of mRNA in all fractions (% of total), errors bars represent SEM on 5 biological replicates (UnF vs F: * pval<0.05). Presence of the mRNA into polysomes was assessed by treating embryos *in vivo* with puromycin before polysome gradient fractionation (F+puro *in vivo*, n=3).

Figure. 2 : **A-** Outline of the translome analysis, performed on three independent polysome profiling dataset. The colored section corresponds to the set of mRNAs actively translated and recruited into polysomes at fertilization (2514 transcripts). **B-** Repartition of maternal mRNAs into translated and untranslated groups before fertilization ($\log_2FC(UnF_{vs}UnF_{puro})>0$; in grey) and after fertilization ($\log_2FC(F_{vs}F_{puro})>0$; in black). mRNAs that were translated in both conditions are represented in striped bars. **C-** Pie chart repartition of maternal mRNAs according to their polysomal behavior at fertilization as determined by the $\log_2FC(F_{vs}UnF)$, corrected by the puromycin control at both time-points.

Figure. 3: **A-** Functional categories over-represented in recruited mRNAs at fertilization. The numbers of transcripts obtained in each category were compared to expected numbers assuming random representation of maternal mRNAs in the translated set in a binomial test,

only categories with a $p\text{-value} < 10^{-5}$ are shown. **B-** Repartition of mRNAs of selected categories according to their recruitment behavior.

Figure. 4: Translation analysis of selected mRNAs by polysome purification on sucrose gradient. mRNAs were detected by RT-PCR amplification in each fraction of the polysome gradient from unfertilized eggs (UnF), 1-hour post-fertilization embryos (F) or puromycin-treated embryos (F+puro). Amplicons were run on agarose gels, quantified using ImageJ software, repartition is shown along the gradient as a percentage of total mRNA. Fraction #1 corresponds to the top of the gradient (free mRNAs) and #21 corresponds to the bottom of the gradient. Values are shown as a mean of at least 5 independent biological replicates, error bars represent SEM (UnF vs F: * $p\text{-value} < 0.05$).

Figure. 5: Translation analysis by polysome purification on sucrose gradient in presence of PP242 inhibitor. mRNAs were detected as described in Fig. 4 in each fraction of the polysome gradient from 1-hour post-fertilization embryos (F), in presence of PP242 inhibitor (F+PP242) or in presence of PP242 and puromycin (F+PP242+puro). Left panel shows mRNAs exhibiting mTOR dependent translation. Right panel shows mRNAs exhibiting mTOR partially independent translation. Values are shown as a mean of at least 5 independent biological replicates, error bars represent SEM (F vs F+PP242: * $p\text{-value} < 0.05$ and F+PP242 vs F+PP242+puro: † $p\text{-value} < 0.05$).

Figure. 6: mRNAs exhibit mTOR independent translation, as described in **Figure. 5**. Values are shown as a mean of 5 independent biological replicates, error bars represent SEM (F+PP242 vs F+PP242+puro: † $p\text{-value} < 0.05$).

Figure. 7: Translation analysis by polysome purification on sucrose gradient in presence of PP242 and U0126 inhibitors. Values are shown as a mean of at least 3 biological replicates, error bars represent SEM (F vs F+PP242: * $p\text{-value} < 0.05$ and F+PP242 vs F+PP242+puro: † $p\text{-value} < 0.05$).

Supplementary figures and tables legends

Figure. S1: Pearson correlation coefficients between the three independent biological replicates. The red lines show the expected correlations of 1 and the blue lines show the linear models, which fit with the data.

Figure. S2: EdgeR differential analysis (MA plot and volcano plot representations) of the *P. lividus* maternal transcriptome before and after fertilization. Similar result was obtained using DESeq analysis (not shown). No significant difference (FDR <0.05) was detected.

Figure. S3: Most represented GOterms associated to maternal mRNAs

Figure. S4: Repartition of maternal mRNAs according to their translation and recruitment behavior as determined by RNA-Seq data analysis.

Figure. S5: Entry into polysome is not correlated to transcript abundance. For each mRNAs, log₂FC between F and UnF polysomal contents were plotted against FPKM, all maternal mRNAs are in grey, recruited mRNAs at fertilization are in red.

Figure. S6: Comparison of mRNA polysomal recruitment as determined by RNA-Seq and qRT-PCR. Comparisons were performed for 13 genes. The line is the linear regression line.

Figure. S7: mTOR inhibition and dual mTOR/MAPK inhibition impacts cell division, protein synthesis activity and 4E-BP degradation. **A-** Cell division is delayed by PP242, an mTOR inhibitor. **B-** Cell division is delayed by U0126, a MAPK inhibitor. **C-** Neosynthesized proteins labeled with [³⁵S]-Methionine separated on SDS-PAGE gel and autoradiography, in unfertilized eggs, 1 hour post-fertilization embryos, and fertilized embryos in presence of PP242, U0126 or both inhibitors. **D-** Protein synthesis activity measured by incorporation of [³⁵S]-Methionine in TCA precipitated proteins, normalized to the values in control fertilized embryos (representative of two independent experiments). **E-** 4E-BP degradation triggered by fertilization was inhibited by PP242, but not by U0126. Western blot is representative of 3 independent experiments.

Figure. S8: Repartition of mRNAs on polysome gradients were not perturbed by U0126 treatment of embryos. mRNAs were detected by sqRT-PCR amplification as described in **Fig. 4**.

Fig S9: Puromycin treatment of control embryos and PP242-treated embryos led to similar

polysome profile. mRNAs were detected by sqRT-PCR amplification as described in **Fig. 4**

Table. S1: Illumina generated data on the twenty-four libraries of the study. 3 independent experiments were done, with four different conditions: before and 1 hour post-fertilization without (UnF; F) or with puromycin treatment (UnF+puro; F+puro). For each condition, polysomal RNA and cytoplasmic RNA were purified. Polysomal fractions were pooled from 3-9 gradients to obtain enough polysomal RNA for libraries construction (in parenthesis, the number of pooled gradients per condition). Cytoplasmic RNA was purified from equal volume of cytoplasmic lysates from each condition, leading to equivalent amount of RNA. Numbers for each library are indicated for the input (paired end 100bp reads), cleaned and mapped reads.

Table. S2: Primers used in this study for sq or qRT-PCR analyses.

Table. S3: List of the most abundant maternal mRNAs (FPKM>500), with their respective translation and recruitment index (as explained in Table. 1). Shadowed lines indicate recruited mRNAs at fertilization. Bold mRNAs indicate mRNAs that were also tested by polysome gradient.

Figures
Figure. 1

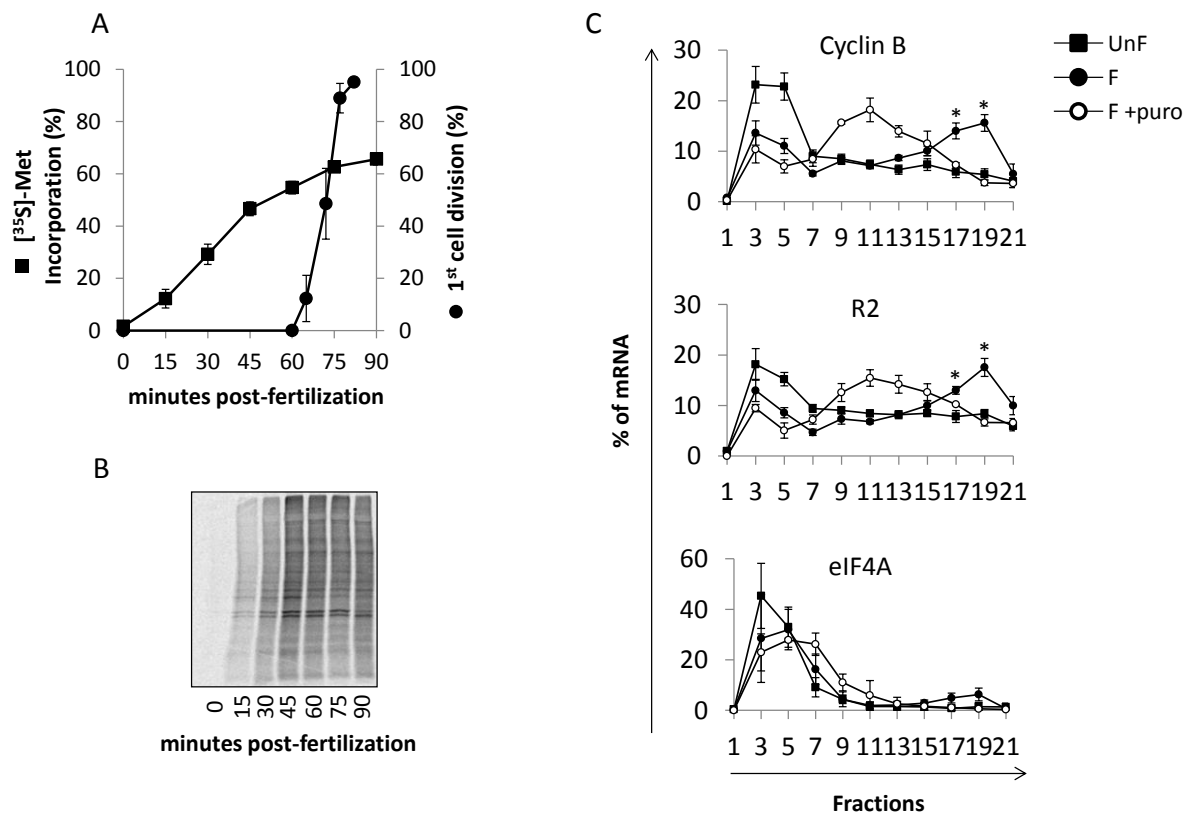


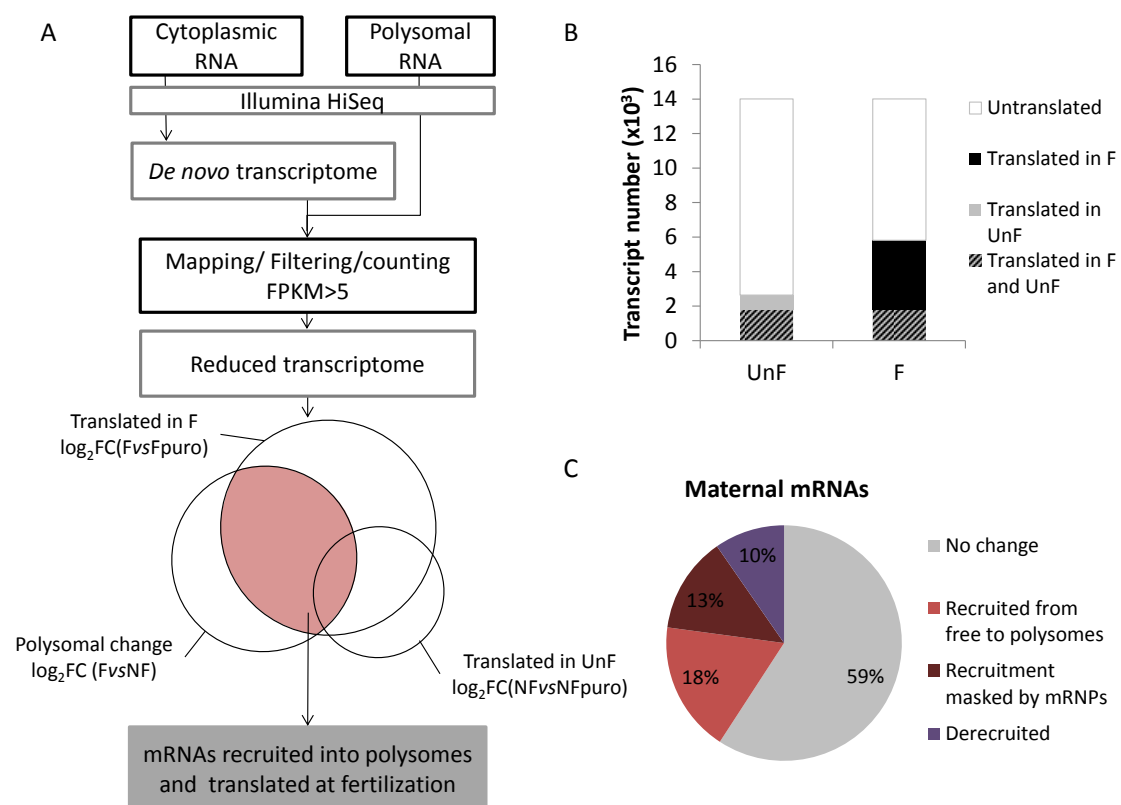
Figure. 2

Figure. 3

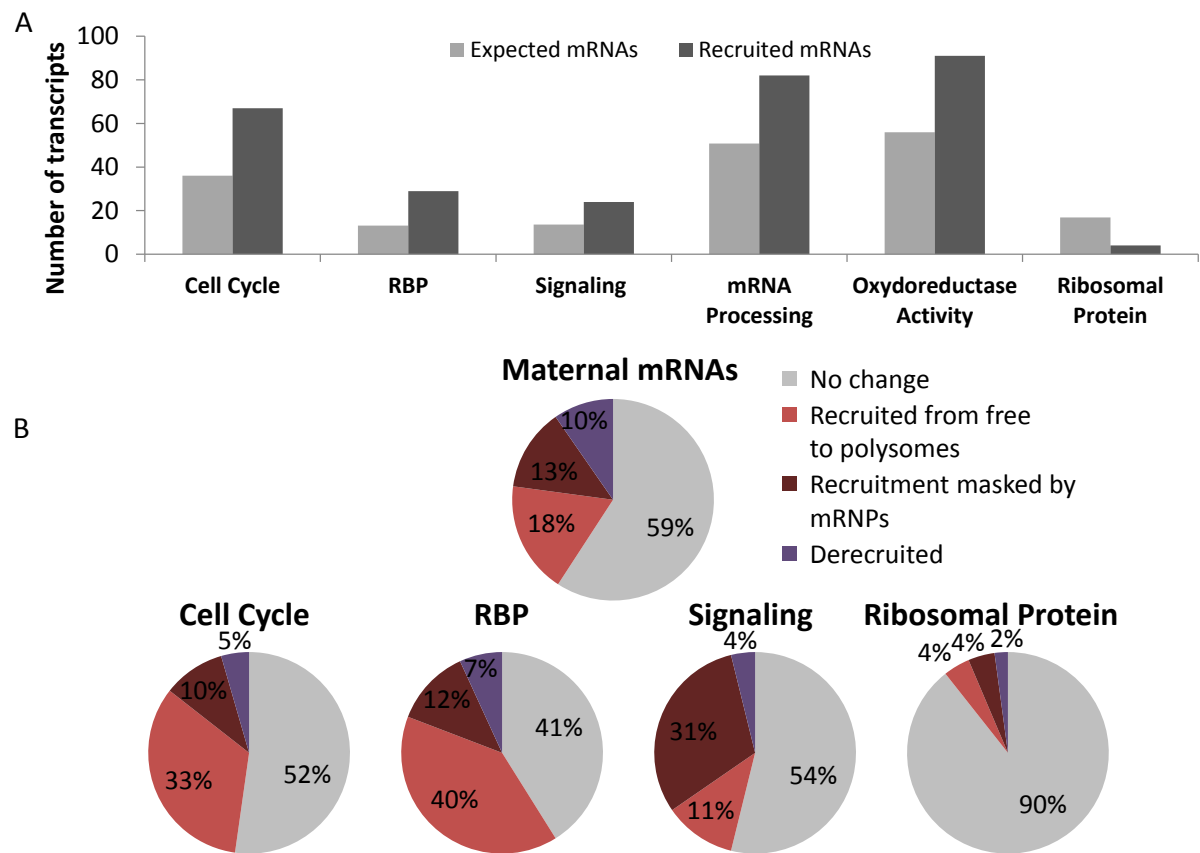


Figure. 4

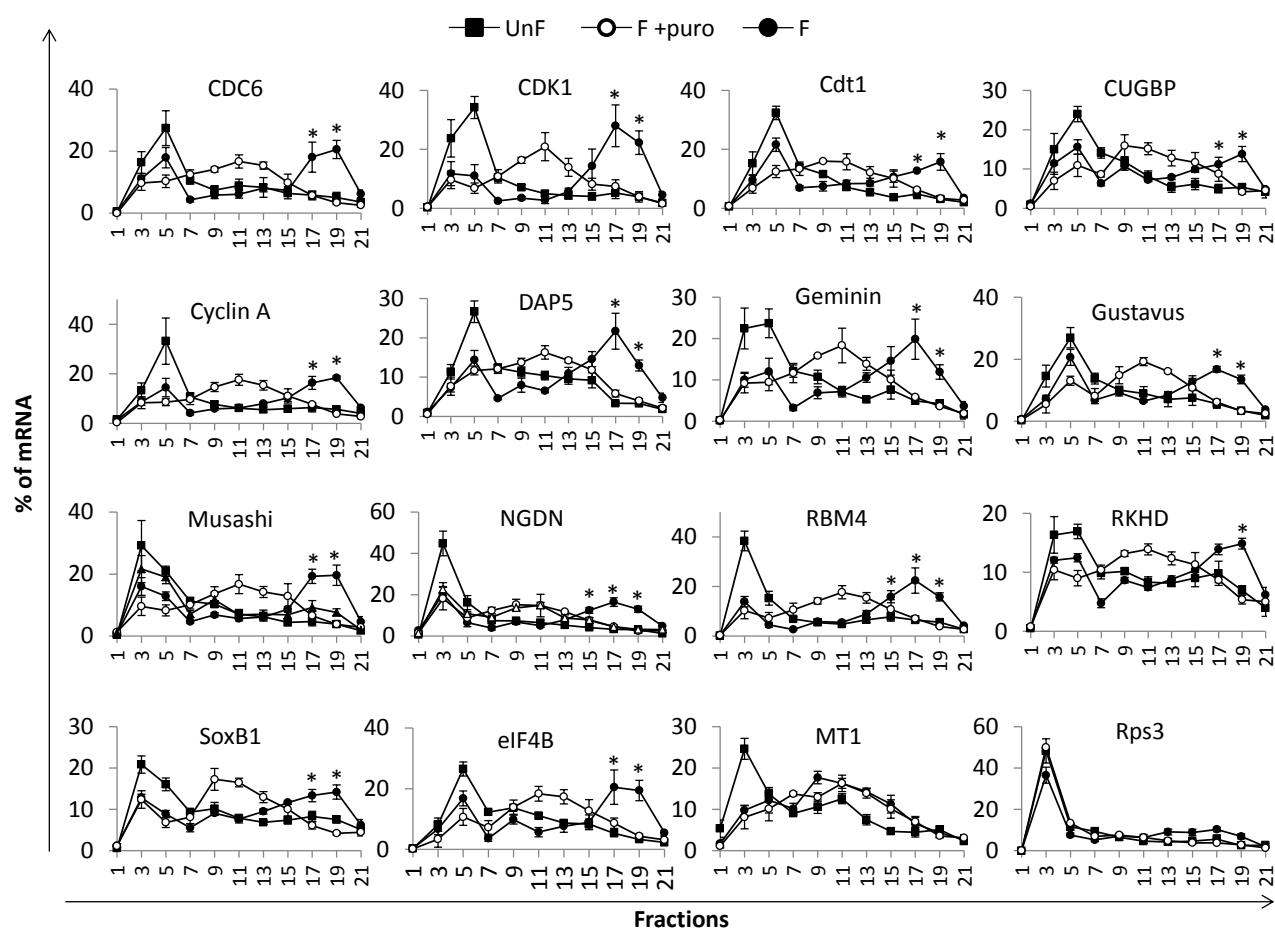


Figure. 5

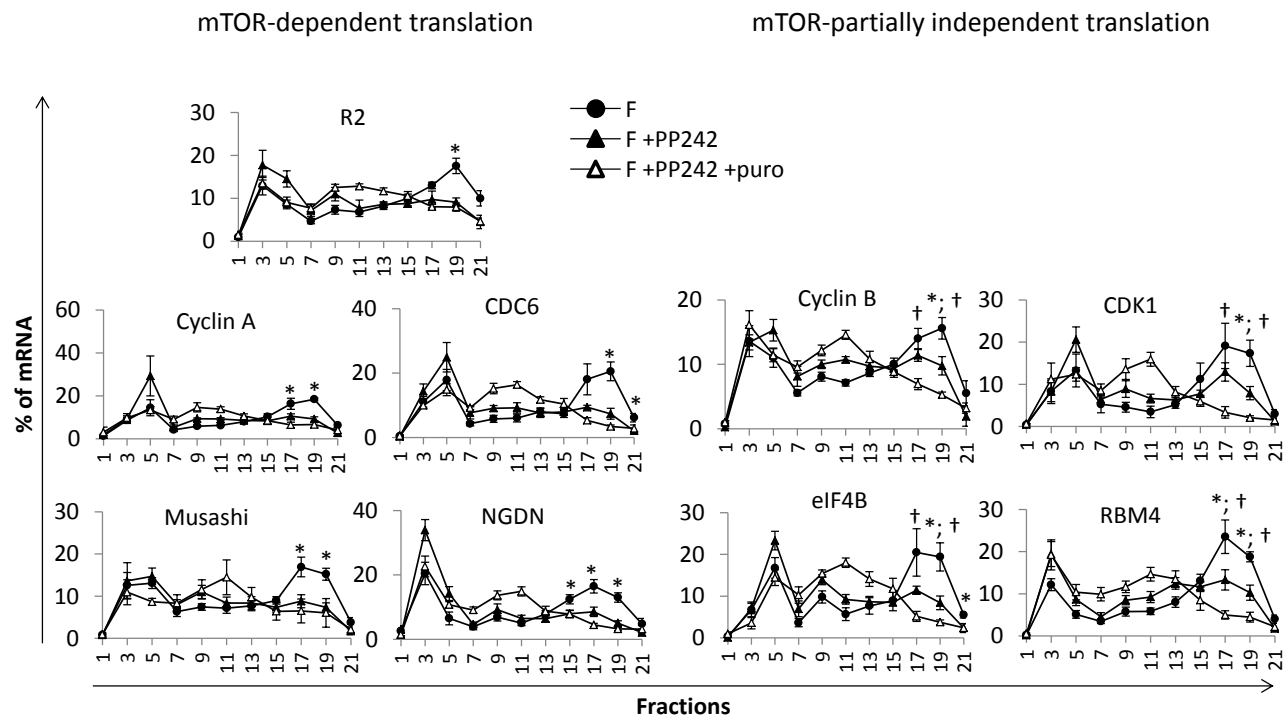


Figure. 6

mTOR-independent translation

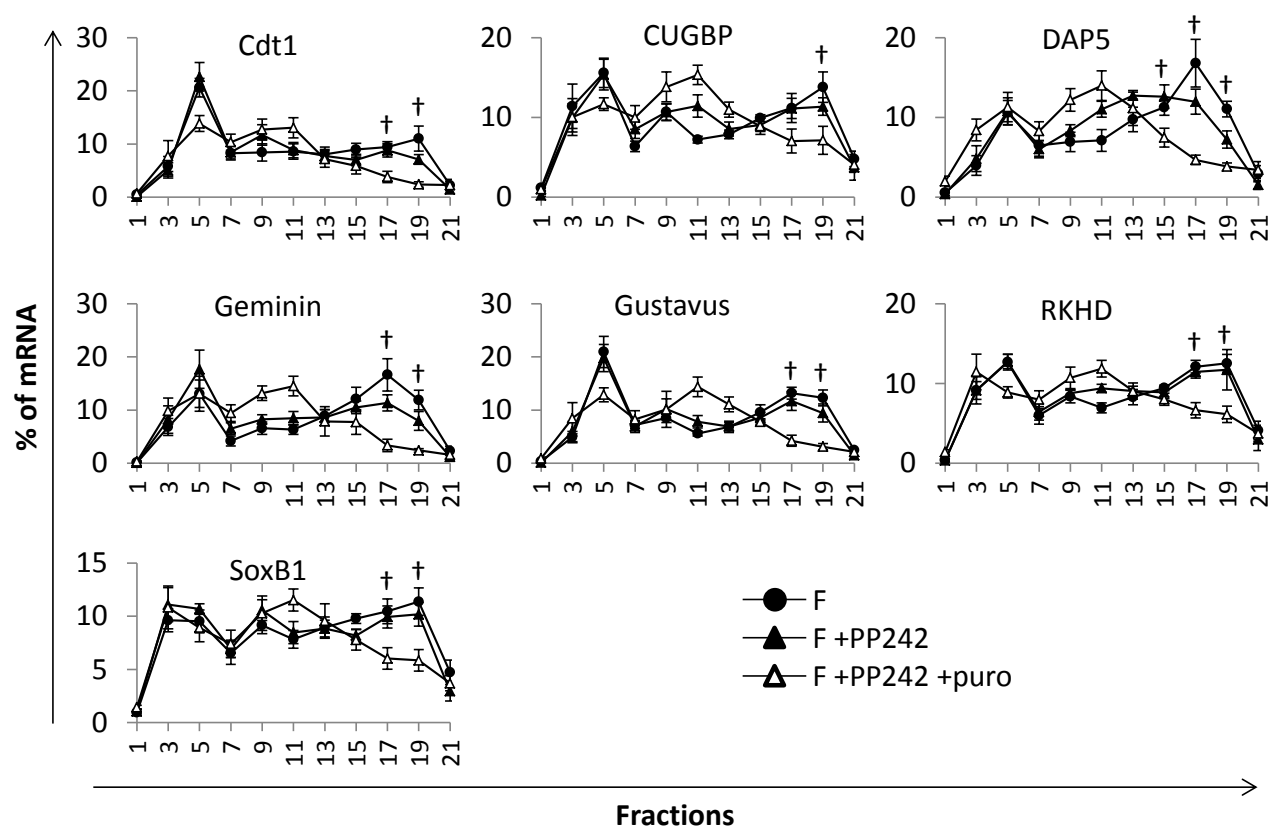


Figure. 7

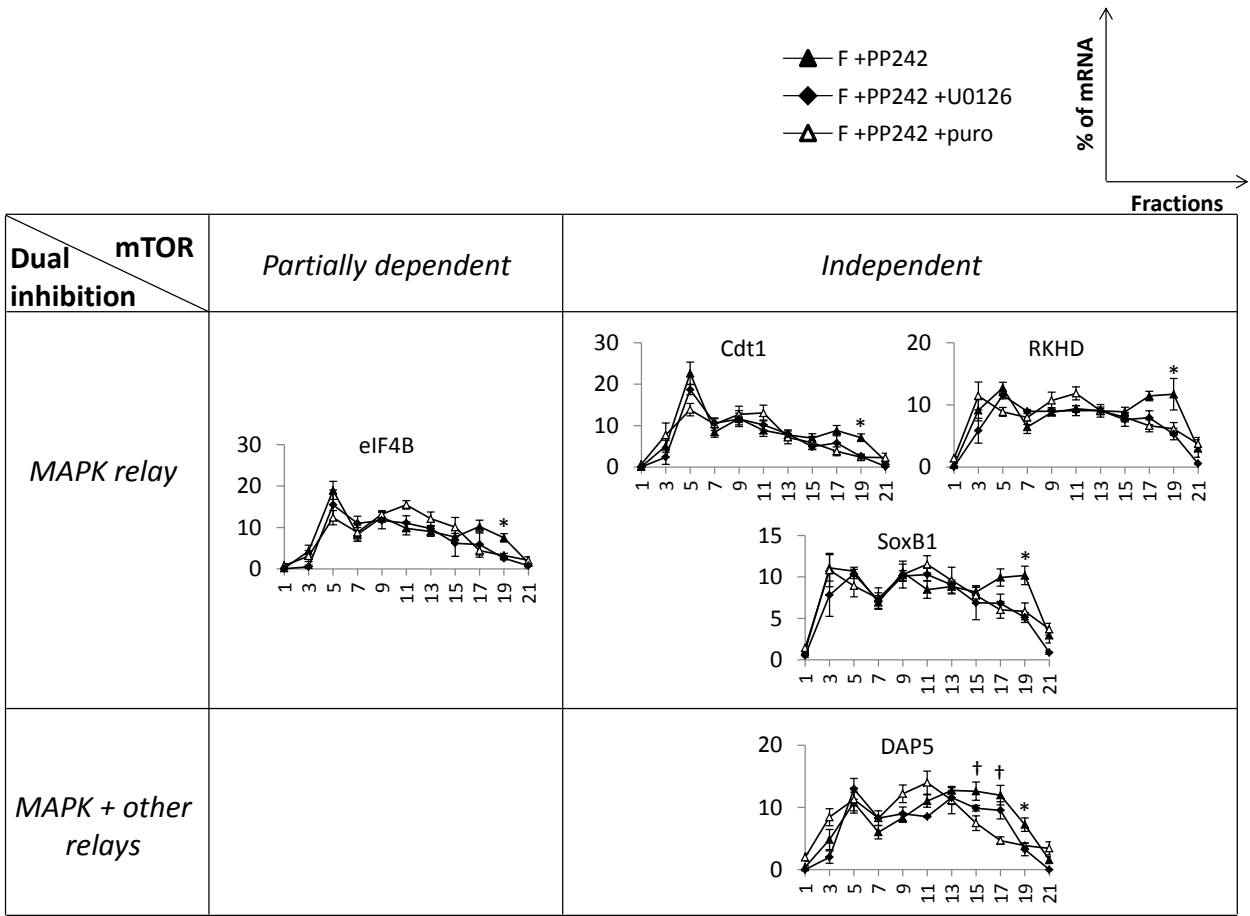


Table. 1

Table 1 : Translated and recruited mRNAs at fertilization

Transcript ID	gene	ogFC (F/Fpuro)	padj (F/Fpuro)	logFC (F/NF)	padj (F/NF)	FPKM	SPU Best Blast Hit	e-value
Cell cycle related genes								
comp77341_c2_seq1	Cyclin B	1,631	2,33E-07	2,964	2,14E-19	3202,66	SPU_015285	0
comp79240_c1_seq1	Cyclin A	1,513	1,81E-06	2,339	5,65E-13	649,47	SPU_003528	0
comp80046_c1_seq2	Ribonucleotide reductase small subunit R2	1,195	7,15E-04	2,645	1,67E-12	4679,83	SPU_024933	0
comp79495_c0_seq1	Cyclin dependant kinase 1 CDK1	1,933	8,15E-10	1,583	8,41E-07	62,15	SPU_002210	0
comp79997_c3_seq5	Geminin	1,211	5,63E-05	0,970	1,73E-03	150,56	SPU_005762	3.88E-76
comp79170_c0_seq2	Cell division control protein 6 cdc6	1,482	6,35E-06	0,944	5,07E-03	154,35	SPU_010595	0
comp78987_c0_seq3	DNA-replication factor cdt1	1,192	1,30E-05	1,393	5,09E-07	72,55	SPU_002046	0
comp76547_c0_seq2	regulator of chromosome condensation 1 RCC1	1,687	2,51E-09	2,426	9,07E-17	103,06	SPU_023992	0
comp69502_c0_seq1	14-3-3 epsilon	0,864	1,17E-02	2,223	1,96E-10	64,30	SPU_003825	2.06E-93
comp77014_c0_seq1	Polo-like kinase 1 PLK1	1,033	1,51E-04	1,342	1,22E-06	77,47	SPU_017949	0
comp78419_c0_seq1	Early mitotic inhibitor EMI1	0,953	4,28E-03	1,417	2,56E-05	14,66	SPU_008889	0
Maternal determinant of development patterning								
comp77686_c1_seq1	SoxB1	1,700	1,87E-06	1,713	3,74E-06	1320,41	SPU_022820	8.83E-148
comp77921_c0_seq1	Gustavus	1,533	5,46E-06	2,582	2,03E-13	75,98	SPU_004717	0
comp79094_c0_seq1	Alk2	1,859	2,63E-08	2,474	1,01E-12	17,77	SPU_016008	0
comp73990_c1_seq1	beta-catenine	1,172	2,00E-03	1,490	1,49E-04	194,50	SPU_009155	0
comp79473_c0_seq3	transforming growth factor beta receptor	1,284	3,16E-04	1,131	1,64E-03	6,38	SPU_027380	0
comp76027_c0_seq8	Transforming growth factor beta Univin	1,799	7,47E-08	2,311	1,16E-11	18,28	SPU_000668	0
comp79158_c0_seq1	Smad4	1,401	3,58E-06	1,447	2,21E-06	14,88	SPU_004287	8.14E-142
RNA-binding proteins								
comp70206_c1_seq4	RBM4	1,597	3,84E-05	3,427	3,15E-16	100,80	SPU_022878	2.10E-25
comp66342_c1_seq4	DAZAP Musashi	1,294	3,29E-05	1,757	6,76E-08	85,10	SPU_024306	9.91E-78
comp79981_c0_seq9	CUG-BP	1,189	1,24E-05	1,401	3,26E-07	7,74	SPU_015850	8.22E-114
comp76987_c1_seq1	RKHD/Pem-3/Mex3B homolog	1,164	9,54E-05	1,072	4,34E-04	854,27	SPU_003290	0
comp78371_c0_seq1	Nova	1,592	8,14E-08	1,103	2,74E-04	10,04	SPU_003114	0
comp68546_c0_seq1	hnRNP K	1,666	3,54E-08	1,849	2,21E-09	90,53	SPU_008011	1.22E-131
comp62631_c0_seq1	hnRNP A	1,825	6,83E-09	1,191	2,06E-04	115,70	SPU_015676	7.53E-89
comp76265_c0_seq4	Histone RNA hairpin-binding protein SLBP	1,246	8,67E-04	2,121	3,72E-08	62,95	SPU_009593	0
Translation regulation								
comp73250_c0_seq1	eIF4E binding protein Neuroguidin	1,366	6,29E-03	1,862	3,19E-04	4,79	SPU_019210	2.83E-148
comp79103_c1_seq1	DAP5	1,398	1,68E-04	1,339	4,26E-04	87,12	SPU_023932	0
comp78411_c2_seq1	eIF4B	0,958	2,71E-03	1,111	6,02E-04	94,72	SPU_004840	7.20E-94
comp78490_c0_seq1	termination factor eRF1	1,847	1,61E-09	1,376	1,55E-05	11,40	SPU_023948	0
comp64074_c0_seq1	initiation factor eIF6	1,554	4,25E-03	1,267	2,71E-02	7,94	SPU_012909	4.69E-160
mRNA processing								
comp78669_c0_seq3	pre-mRNA splicing factor SF3a	1,828	5,33E-11	2,227	1,60E-14	32,04	SPU_007675	0
comp77748_c1_seq1	splicing factor p54	1,692	4,21E-07	1,723	5,97E-07	17,86	SPU_023789	6.37E-138
comp80399_c5_seq2	Splicing factor, arginine/serine-rich 6	1,550	5,32E-07	1,529	1,41E-06	81,34	SPU_002681	1.04E-79
comp77662_c0_seq8	THO complex 4	1,447	8,34E-06	2,473	2,88E-13	16,07	SPU_010685	8.63E-57
comp80045_c0_seq2	THO complex 5	1,562	7,83E-06	1,203	7,08E-04	4,62	SPU_024067	0
Metabolism, transport								
comp78749_c0_seq1	Glutamine synthase	1,221	1,22E-04	1,632	5,11E-07	1066,31	SPU_023123	0
comp76283_c0_seq1	Vacuolar ATP synthase subunit B	1,588	5,15E-06	2,431	1,65E-11	35,06	SPU_016414	0
comp76633_c0_seq1	solute carrier family 11	1,162	1,90E-03	2,085	4,14E-08	6,17	SPU_023546	0
comp64211_c0_seq1	GDP-fucose transporter 1	2,086	1,95E-10	1,783	1,07E-07	28,70	SPU_006903	0
comp74935_c0_seq4	Spermidine synthase	0,908	2,92E-02	2,147	4,64E-07	6,46	SPU_018922	2.25E-178
Proteases								
comp75368_c0_seq2	Nocturnin, CCR4 protein homolog	2,293	1,23E-06	2,455	3,88E-07	2,75	SPU_020125	0
comp72397_c0_seq1	ubiquitin-conjugating enzyme E2S	0,821	2,05E-02	1,445	1,48E-04	63,68	SPU_005257	1.96E-127
Untranslated mRNAs								
comp73316_c0_seq1	translation initiation factor eIF4A	1,206	3,44E-03	0,342	4,90E-01	59,53	SPU_023083	0
comp61766_c0_seq1	ribosomal protein rps3	-1,398	1,04E-01	-2,317	1,55E-02	8,27	SPU_013662	2.48E-149
comp75920_c1_seq1	metallothionein MT1	-3,614	2,49E-19	-1,656	2,86E-05	2152,71	SPU_017989	2.24E-11

Supplementary figures and tables

Figure. S1

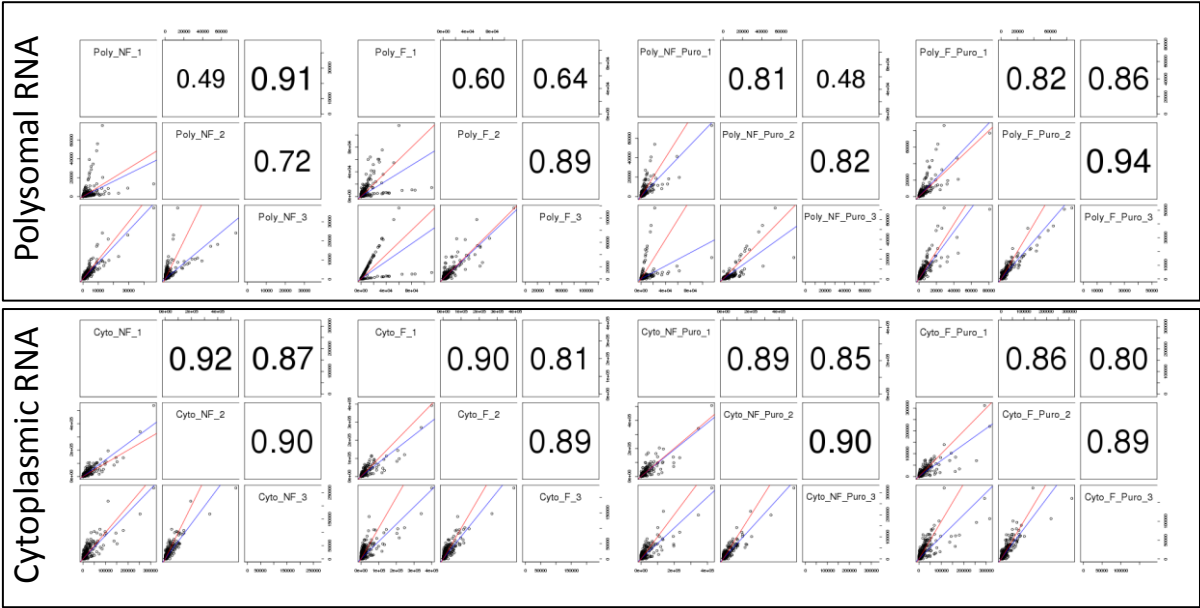


Figure. S2

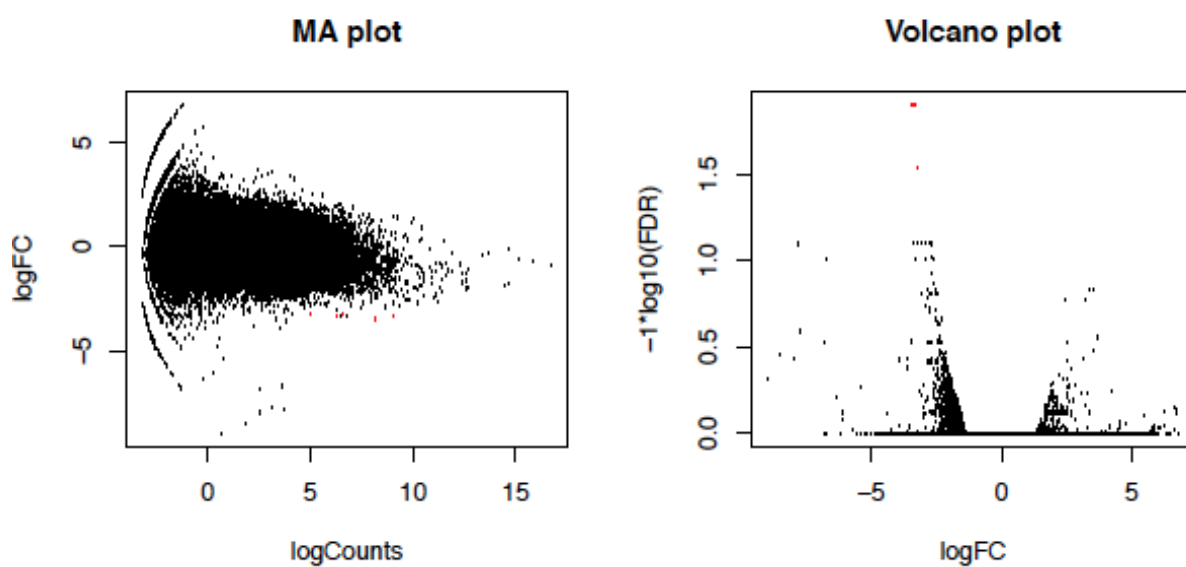


Figure. S3

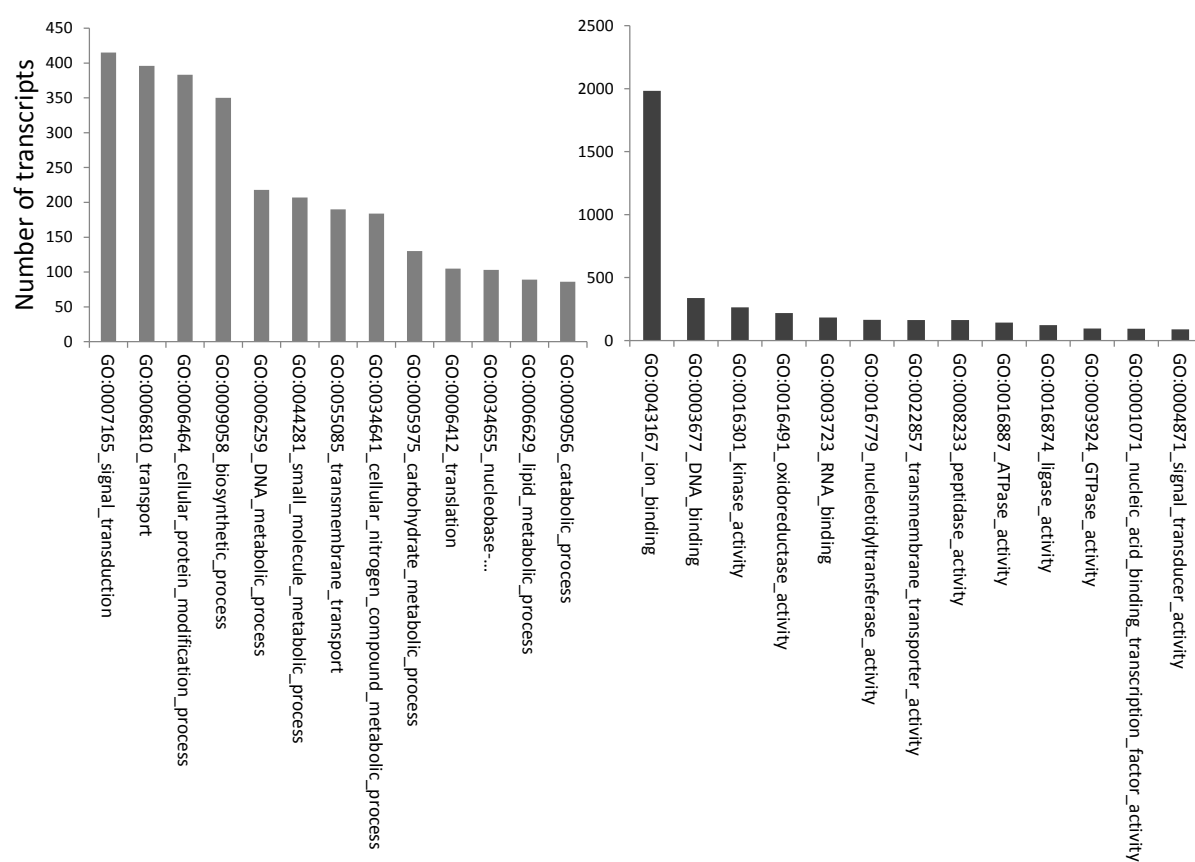


Figure. S4

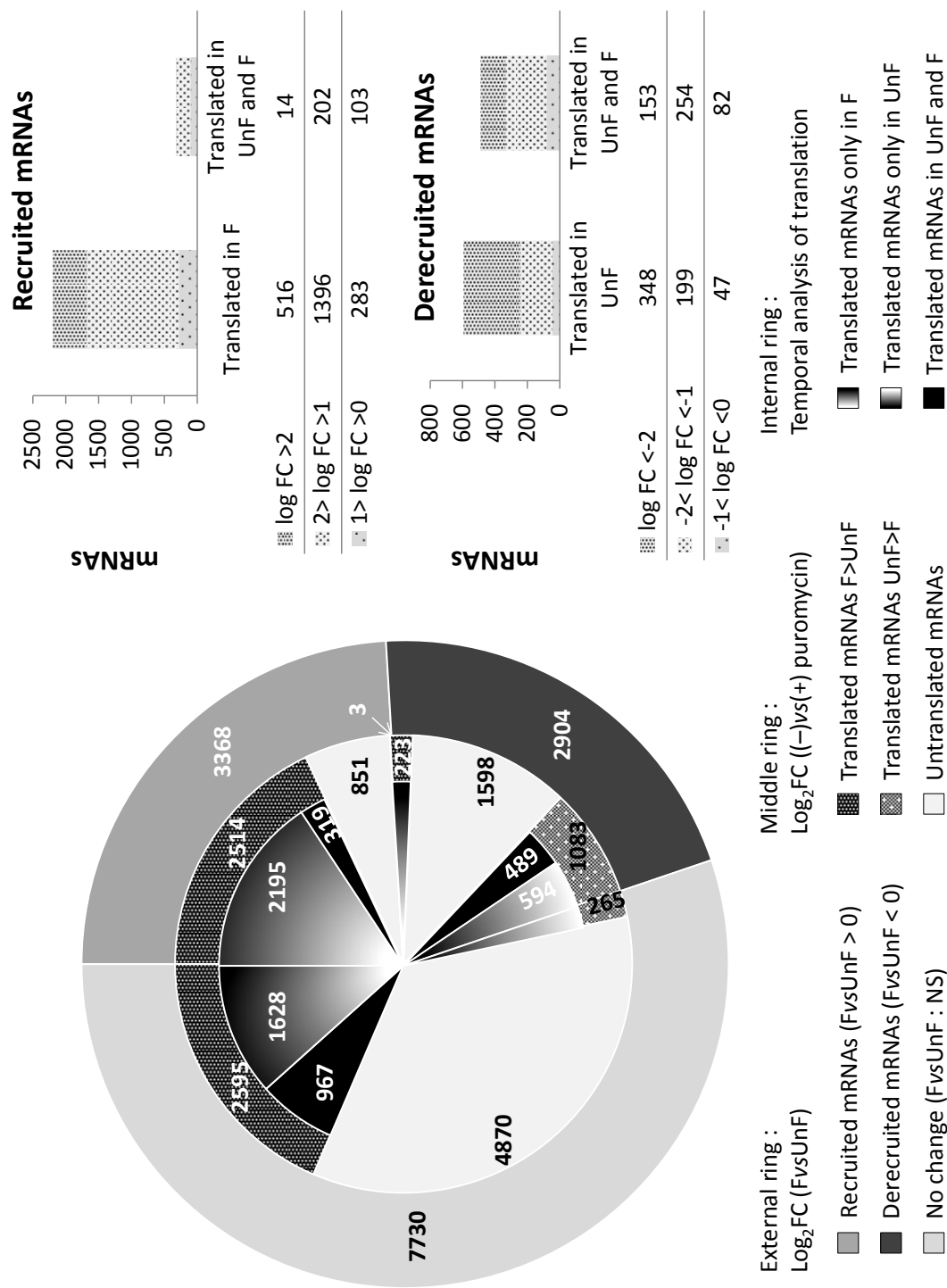


Figure. S5

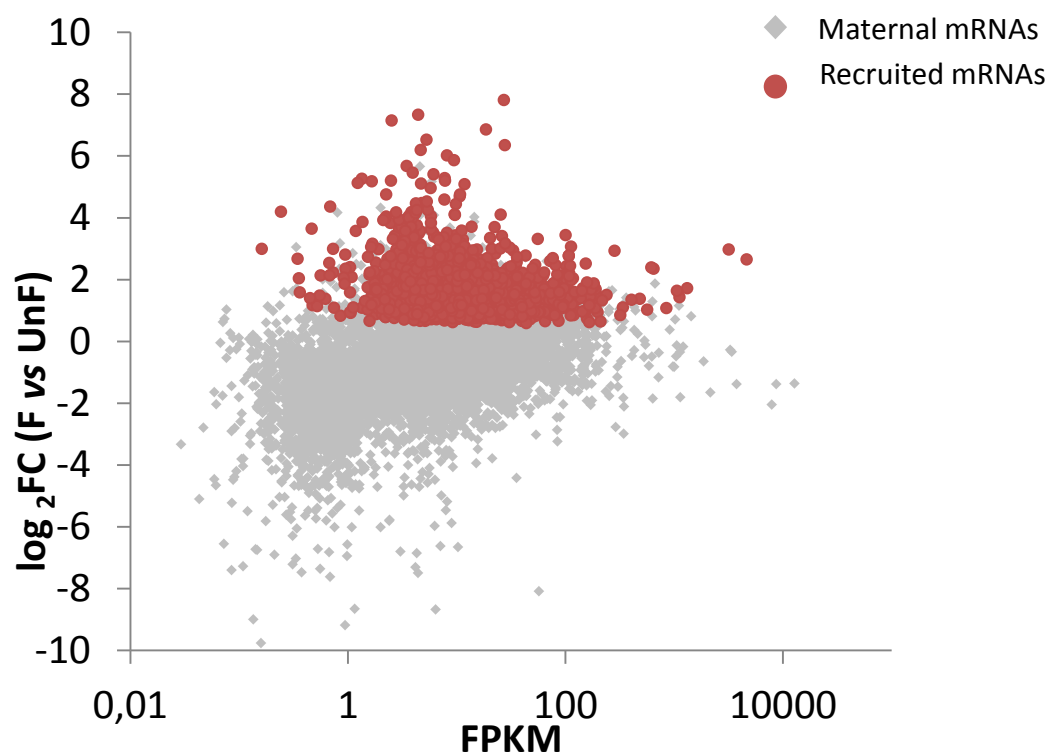


Figure. S6

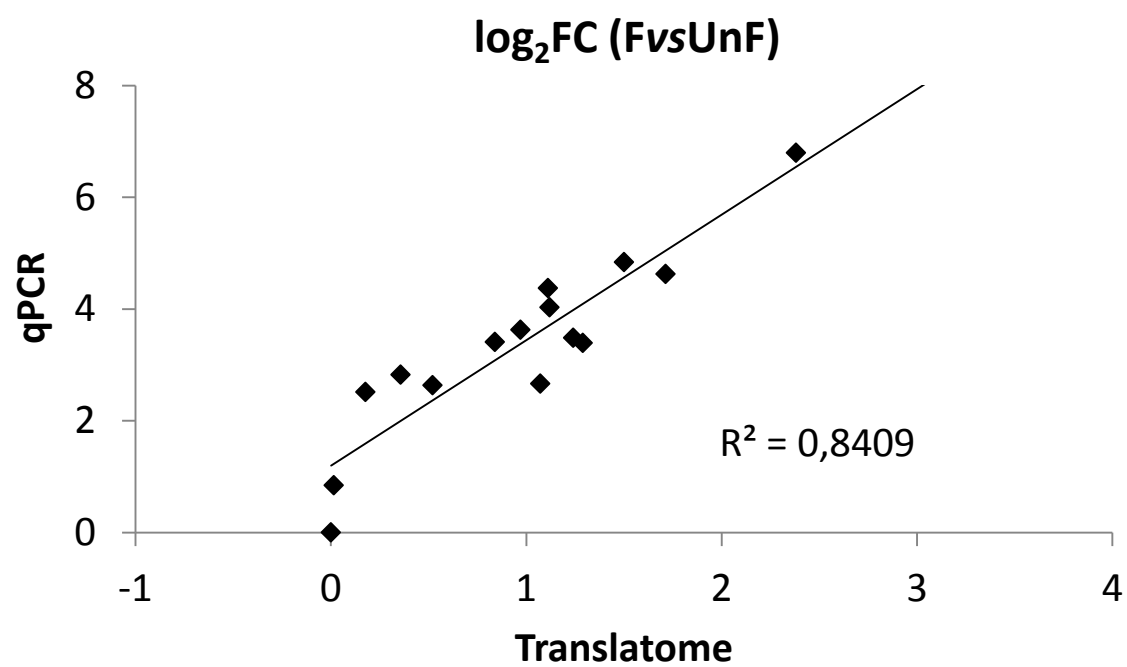


Figure. S7

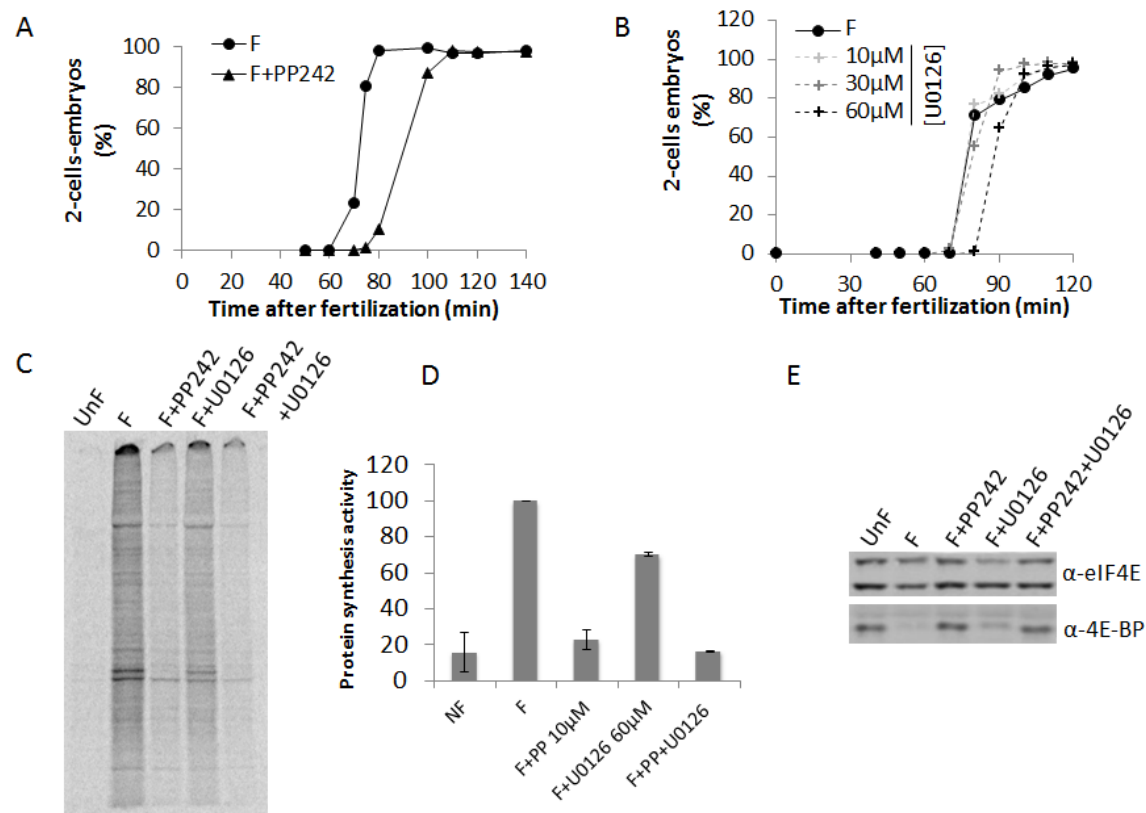


Figure. S8

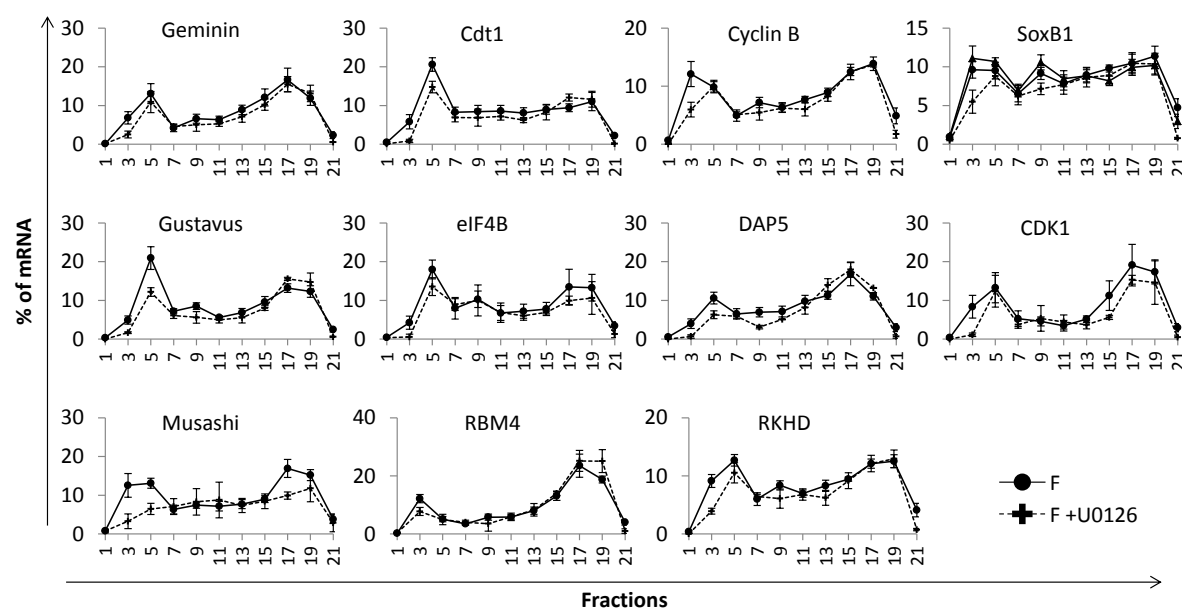


Figure. S9

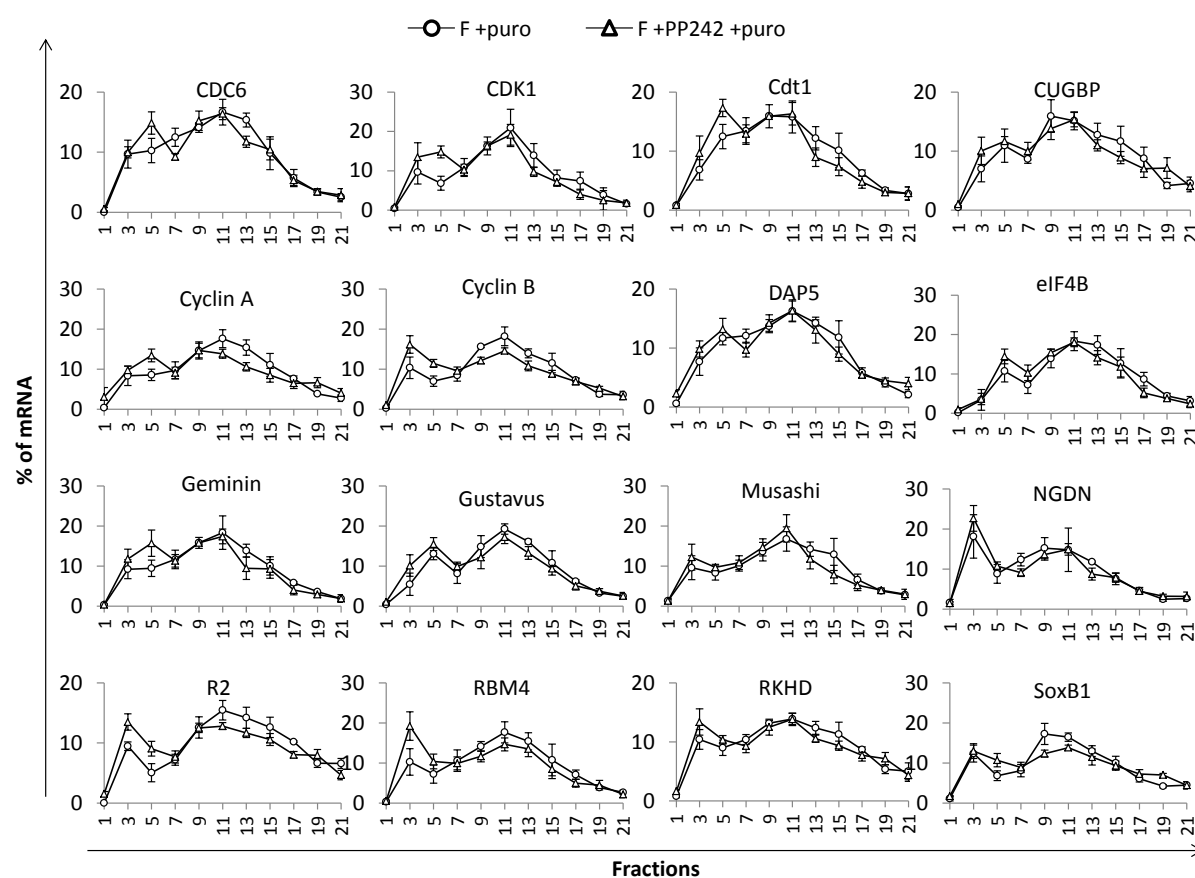


Table. S1

Table S1: Summary of Illumina generated data

Sample type	Independent samples	Input read pairs	cleaned read	mapped reads	
Polysomal fractions	NF	A1 (8)	34 030 616	32 902 935	70,28%
		A2 (7)	33 704 324	32 418 813	74,28%
		A3 (9)	35 499 748	34 408 317	68,94%
	F	B1 (4)	33 285 471	32 136 980	66,00%
		B2 (4)	37 618 772	36 343 907	66,21%
		B3 (3)	37 194 989	36 171 153	63,96%
	NF+puro	C1 (4)	33 883 652	32 823 787	64,22%
		C2 (4)	27 565 328	26 661 893	66,89%
		C3 (8)	29 567 387	28 502 813	69,13%
	F+puro	D1 (4)	28 867 787	28 026 934	64,15%
		D2 (4)	34 750 950	33 560 209	65,57%
		D3 (4)	33 714 918	32 715 942	62,77%
Cytoplasmic RNA	NF	E1	31 155 992	30 228 804	72,11%
		E2	35 472 877	34 347 325	71,77%
		E3	30 658 576	29 710 431	66,81%
	F	F1	33 950 363	32 767 073	67,14%
		F2	26 870 053	26 064 389	67,95%
		F3	30 809 143	29 899 105	61,48%
	NF+puro	G1	37 256 715	36 071 092	69,99%
		G2	34 317 375	33 229 198	70,21%
		G3	35 483 092	34 374 527	63,15%
	F+puro	H1	37 936 744	36 783 064	60,17%
		H2	33 916 426	32 741 477	60,08%
		H3	36 282 397	35 039 346	57,84%

Table. S2

Table S2 : primers used in this study

Gene	Symbol	Primer sequence	Comp#	Size bp
Ribonucleotide reductase small subunit	R2	5'-TTCGCTGCCAGTGATGGA-3' 5'-TCGGCAACCTGGACTTCCT-3'	comp80046_c1_seq2	70
Cyclin B	CycB	5'-CAAAGAGCATGGCTGTTCAA-3' 5'-CCATTGTATCCATCGCCTCT-3'	comp77341_c2_seq1	234
Cyclin A	CycA	5'- CCAACCATGGCCCACTATAC-3' 5'- ACCCCATCTCCCATCCTTAC-3'	comp79240_c1_seq1	243
Cyclin-dependent kinase 1	CDK1	5'- CTTTCCAAAGTGGACGAACC -3' 5'-AAGGACGGGAACGAAAGACT -3'	comp79495_c0_seq1	198
Transcription factor SoxB1	SoxB1	5'-TTAGCCATTTGTGCAGCTTG -3' 5'-ACCAACACCTGAACGGCTAC-3'	comp77686_c1_seq1	108
Geminin	Gem	5'- TCAAAGACACGTCCATCAGC-3' 5'-CAACGACCTTGAGCTTGTC-3'	comp79997_c3_seq5	189
Cell division control protein 6	CDC6	5'- GCAGGAGATGTCAGGAAAGC -3' 5'-TGGAGGAGGGAACCTTCTT -3'	comp79170_c0_seq2	199
DNA replication factor Cdt1	Cdt1	5'- TGGAACTGGTTGCCAAGAAT -3' 5'- CTCCTCAGGGGTTCTCAACA-3'	comp78987_c0_seq3	199
CUG binding protein, CELF2	CUGBP	5'- CCTCGCTCAGAGTCAAGCATT-3' 5'-CCTGTTGAGCCCGGTGTAAC -3'	comp79981_c0_seq9	74
Ring and KH-domain protein, Mex3B-like	RKHD	5'- GCTACCCGAGCTGATGCTAC -3' 5'-CAACCGTACGAAGGTCCACT -3'	comp76987_c1_seq1	146
RNA binding protein 4	RBM4	5'-TCAGAGGTGGAAGAGGAGGA -3' 5'-CCTTGCTCTGTAGGGGTAC -3'	comp70206_c1_seq4	196
Euc. Initiation Factor 4B	eIF4B	5'- GGAGGAGCAAAGCCTGTAGA-3' 5'- ACGCGTTCTGCTTTCTCTTC-3'	comp78411_c2_seq1	200
Gustavus, Spry	Gus	5'- CGTGAACTCGCATACAGTGG-3' 5'-ACATGCAGTCCTCTCGTGAA -3'	comp77921_c0_seq1	229
neuroguidin	NGDN	5'- AATCAATGGAGACCCTGCTG-3' 5'-GCATCTCCTTCTCTGCTTG -3'	comp73250_c0_seq1	206
RNA-binding protein Musashi homolog / DAZAP	Mus	5'- AGCCACACCTGATGATCTCC-3' 5'- TGGGCATGGCTTTCTTAATC-3'	comp66342_c1_seq4	199
DAP5, euc. Initiation Factor 4 gamma 2	DAP5	5'-AGACGAGCAGGACCAGAGAG -3' 5'-GTCGGCCTACAGTGGTGATT -3'	comp79103_c1_seq1	208
CathepsinD-like, lipocalcin7	CATD	5'-AAAGGCTACTGGCAGCTTCA-3' 5'-GGTTGGGATCTTGTGCACT-3'	comp77711_c0_seq5	200
Euc. Initiation Factor 4A	eIF4A	5'-TGGTCAAGAAGGAAGAAC-3' 5'-CGTCTCATACAAGTCACA -3'	comp73316_c0_seq1	103
Methallothionein	MT1	5'-ATGTTGCCAAGATGGAAAGC -3' 5'-GGGTCCGTGCTAACGTCTAA -3'	comp75920_c1_seq1	196
Ribosomal protein 3 small subunit	RPS3	5'-GGACGCATGATCTTCACCTT -3' 5'-GGTGGTGGTCTCTGGTAAGC -3'	comp61766_c0_seq1	168

Table. S3

Table S3: List of the most abundants maternal mRNAs (FPKM>500)

Transcript ID	gene	logFC (F/Puoro)	padj (F/Puoro)	logFC (F/NF)	padj (F/NF)	FPKM	SPU Best Blast Hit	e-value
comp80046_c1_seq2	RIR2 Ribonucleotide reductase small chain	1.195	7.15E-04	2.645	1.67E-12	4679.83	SPU_024933	0
comp77341_c2_seq1	CycB cyclin B	1.631	2.33E-07	2.964	2.14E-19	3202.66	SPU_015285	0
comp77686_c1_seq1	SoxB1	1.700	1.87E-06	1.713	3.74E-06	1320.41	SPU_022820	8.83E-148
comp78749_c0_seq2	Glutamine synthetase	1.142	2.28E-04	1.421	9.61E-06	1128.45	SPU_023123	0
comp78749_c0_seq1	Glutamine synthetase	1.221	1.22E-04	1.632	5.11E-07	1066.31	SPU_023123	0
comp76987_c1_seq1	RKHD/Mex3B/Pem3	1.164	9.54E-05	1.072	4.34E-04	854.27	SPU_003290	0
comp79240_c1_seq1	CycA cyclin A	1.513	1.81E-06	2.339	5.65E-13	649.47	SPU_003528	0
comp79240_c1_seq2	CycA cyclin A	1.649	5.30E-07	2.381	1.67E-12	619.43	SPU_003528	0
comp70565_c3_seq1	hnRNP-like	1.316	1.48E-03	1.012	2.30E-02	565.84	SPU_000477	6.40E-65
comp73815_c0_seq1	Cleavage Histone H1	-0.768	3.05E-02	0.710	5.52E-02	1026.35	SPU_024567	5.06E-73
comp73815_c0_seq2	Cleavage Histone H1	-0.858	1.60E-02	0.375	3.37E-01	912.56	SPU_024567	4.28E-73
comp75920_c1_seq2	MT1 metallothionein	-3.716	6.39E-19	-1.364	1.12E-03	12773.51	SPU_017989	5.80E-14
comp75270_c0_seq1	cytochrome b	-2.110	8.25E-05	-1.384	1.06E-02	8698.29	SPU_016012	8.15E-18
comp75920_c1_seq1	MT1 metallothionein	-3.614	2.49E-19	-1.656	2.86E-05	2152.71	SPU_017989	2.24E-11
comp75920_c1_seq4	MT1 metallothionein	-4.218	1.00E-17	-1.813	1.42E-04	1144.19	SPU_017989	2.65E-12
comp78526_c0_seq5	Histone H3.3	-1.735	2.21E-06	-0.831	2.96E-02	1004.26	SPU_015647	9.32E-93
comp61924_c0_seq1	Histone H3.3	-1.906	1.19E-08	-0.822	1.68E-02	978.07	SPU_028062	1.14E-73
comp78526_c0_seq3	Histone H3.3	-1.742	8.31E-08	-1.175	6.74E-04	720.65	SPU_015647	6.95E-93
comp60951_c0_seq1	Selenoprotein W	-3.378	1.20E-14	-1.855	1.61E-05	635.00	SPU_026490	6.56E-30
comp56639_c0_seq1	Histone H4	-2.659	7.83E-12	-0.793	4.47E-02	586.77	SPU_018670	9.39E-48
comp69555_c0_seq2	Cleavage Histone H2b	-1.988	1.27E-06	-0.344	4.53E-01	3404.22	SPU_001312	1.22E-77
comp69555_c0_seq1	Cleavage Histone H2b	-2.308	9.45E-11	-0.280	4.83E-01	3279.07	SPU_001312	1.03E-77
comp66449_c1_seq1	Histone H3.3	-1.779	3.54E-07	-0.651	8.73E-02	1873.98	SPU_008231	4.05E-12
comp69718_c0_seq2	Cleavage Histone H2a	-1.843	1.29E-06	-0.349	4.14E-01	1131.21	SPU_022075	9.66E-70
comp69718_c0_seq3	Cleavage Histone H2a	-1.742	5.52E-06	-0.373	3.87E-01	722.51	SPU_022075	9.77E-70
comp69718_c0_seq1	Cleavage Histone H2a	-1.844	1.02E-06	-0.491	2.27E-01	625.60	SPU_022075	7.66E-70
comp69718_c0_seq4	Cleavage Histone H2a	-1.797	1.67E-06	-0.112	8.10E-01	545.33	SPU_022075	7.77E-70
comp67174_c0_seq1	translation initiation factor eIF1	-3.208	4.72E-20	-0.518	1.54E-01	530.38	SPU_016208	1.29E-53
comp78178_c2_seq1	HMG-Box prot	-0.452	1.88E-01	1.148	7.16E-04	1108.79	SPU_027981	1.33E-58
comp77245_c0_seq1	receptor accessory protein REEP5	-0.204	5.83E-01	1.870	4.61E-08	666.91	SPU_018377	4.43E-83
comp70206_c0_seq2	Actin CylIB	0.608	1.43E-01	1.288	2.07E-03	632.17	SPU_009483	0
comp67883_c0_seq1	dual oxidase maturation factor 1DuoxA	0.497	2.11E-01	0.813	4.51E-02	628.98	SPU_025513	0
comp70206_c0_seq1	Actin CylIB	0.607	1.44E-01	1.037	1.36E-02	573.94	SPU_009483	0
comp76059_c1_seq4	DEAD box polypeptide Ddx5	-0.645	5.84E-02	0.027	9.51E-01	534.48	SPU_010343	0
comp59090_c0_seq1	Ubiquitin	-0.057	8.84E-01	-1.389	6.99E-05	3765.37	SPU_021496	1.62E-46
comp59002_c0_seq1	Tubulin alpha5	0.089	8.35E-01	-0.178	6.91E-01	1208.05	SPU_026444	1.99E-50
comp75920_c2_seq1	Tubulin	-0.563	2.05E-01	-0.138	7.91E-01	1056.82	SPU_012679	0
comp75920_c2_seq3	Tubulin	-0.123	7.57E-01	-0.484	2.15E-01	1044.92	SPU_012679	0

4. Article 4

« Translational control of translational machinery at sea urchin fertilization »

Chassé, H., Boulben, S., Cormier, P., Morales, J., (2015)

En préparation

La disponibilité de la machinerie traductionnelle à la fécondation de l'embryon d'oursin joue un rôle prépondérant dans le recrutement polysomal et l'entrée en cycle cellulaire. La formation du complexe eIF4F est considérée comme l'un des deux facteurs limitants de l'initiation de la traduction. En effet, dans les œufs non fécondés, la protéine eIF4E (protéine de liaison à la coiffe de l'ARNm) est séquestrée par la protéine inhibitrice 4E-BP, et elle n'est libérée qu'à la fécondation, sous l'action de la voie mTOR sur 4E-BP. La libération d'eIF4E permet la forte hausse du niveau de traduction indispensable au développement embryonnaire précoce.

Grâce au traductome de l'embryon précoce d'oursin, nous savons à présent que tous les messagers maternels ne sont pas uniformément traduits à la fécondation, comme il était supposé. Dans certaines espèces, la sélectivité de traduction dans l'embryon précoce est possible par la présence de facteurs d'initiation embryonnaires. Or, chez l'oursin, ce type de facteurs n'existe pas, ne laissant place qu'aux facteurs également présents chez l'adulte. Cependant, une hypothèse est que les facteurs classiques dirigent la sélectivité du recrutement, en étant eux-mêmes traductionnellement régulés. Cette question a fait l'objet du quatrième article de ce travail de thèse.

De manière intéressante, l'analyse du traductome a montré qu'un seul facteur d'initiation canonique est traduit à la fécondation : eIF4B ; d'autre part, un facteur non-canonique impliqué dans la traduction sélective, DAP5 est également fortement traduit. De ce fait, et en raison de l'absence de traduction des autres membres du complexe classique nous avons étudié la présence dans l'embryon précoce d'oursin, d'ARNm codant pour des facteurs d'initiation non-canoniques. Fait intéressant, les messagers d'eIF4E2, d'eIF4E3 et de hnRNP-Q sont bel et bien présents dans l'embryon précoce.

Nous avons poursuivi cette étude par l'établissement du profil de recrutement polysomal de ces ARNm. Ils sont effectivement traduits et recrutés à la fécondation, avec des dépendances à l'activité de la voie mTOR qui diffèrent en fonction du transcrit ciblé. Dans la littérature, ces facteurs d'initiation non-canoniques sont souvent associés à une répression globale de la traduction, et à une traduction sélective de certains ARNm, ce qui pourrait expliquer la sélectivité dans le recrutement polysomal. Il est donc possible que ces initiateurs non-canoniques de la traduction néosynthétisés forment par la suite des complexes d'initiation alternatifs (**Figure. 33**), comme cela a déjà été démontré dans d'autres modèles et d'autres conditions physiologiques ou physiopathologiques.

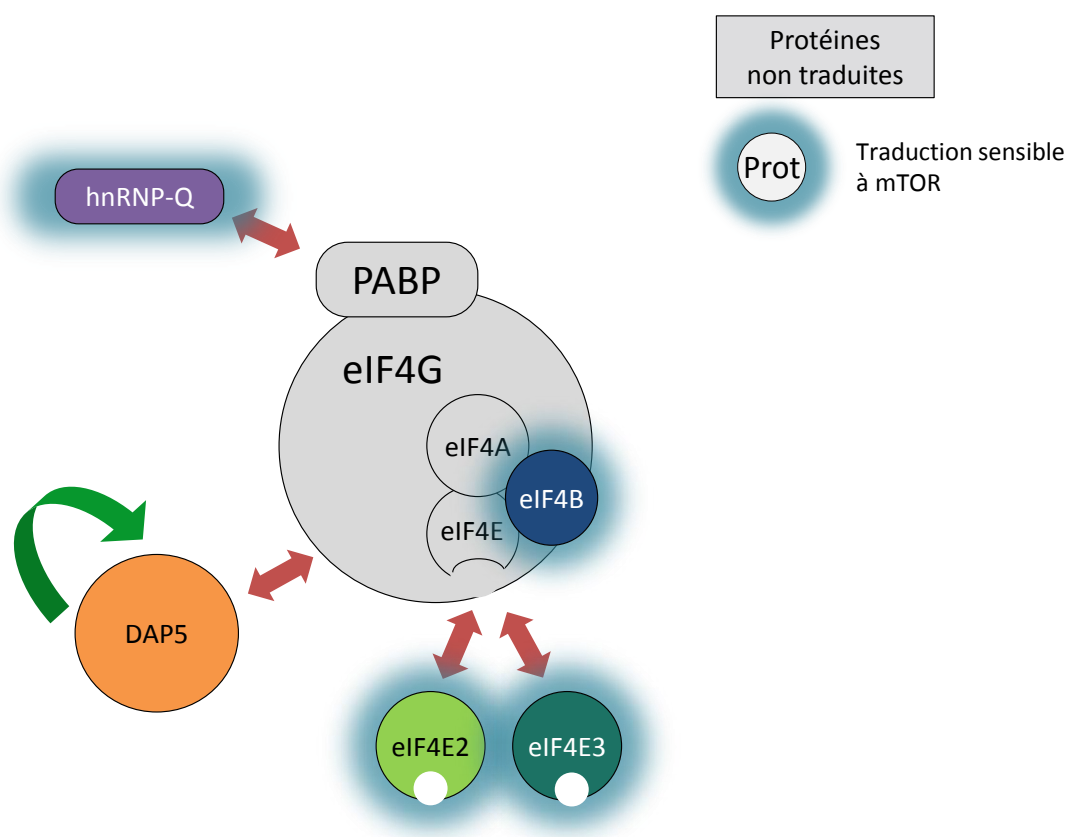


Figure 33 : Régulations traductionnelles du complexe eIF4F. Le complexe eIF4F est composé d'eIF4A, eIF4E1 et eIF4G, associé aux modulateurs eIF4B et PABP. eIF4E2, eIF4E3, hnRNP-Q et DAP5 sont des homologues des protéines d'eIF4F. Les protéines colorées sont traduites et recrutées à la fécondation, ce qui n'est pas le cas des protéines grisées. Les flèches rouges indiquent les échanges possibles entre facteurs d'initiation canoniques et non-canoniques. Le halo bleu entourant certaines protéines indique que leur traduction est dépendante de l'activité de la voie de signalisation mTOR.

Translational control of the eIF4F complex members at sea urchin fertilization

Chassé Héloïse^{1,2}, Boulben Sandrine^{1,2}, Cormier Patrick^{1,2}, Morales Julia^{1,2‡}

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 8227 Laboratory of Integrative Biology of Marine Models, Team Translation Cell Cycle and Development, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, F-29688, Roscoff cedex, France.

² CNRS, UMR 8227 Laboratory of Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, F-29688, Roscoff cedex, France.

[‡] Author for correspondence: (morales@sb-roscoff.fr)

Key words: sea urchin fertilization, translational control, eIF4F complex, mTOR pathway

Introduction

Regulation of protein synthesis is critical for cell growth, development and survival; and is now recognized as a key control of gene expression (Schwanhäusser et al., 2011; Sonenberg and Hinnebusch, 2007; Thompson et al., 2007). Translation is predominantly regulated during the initiation step. The majority of eukaryotic mRNAs are translated using a cap-dependent mechanism: eukaryotic initiation factors (eIFs) recognize the 5' cap structure on the mRNA, recruit the 40S ribosomal subunit, scan the mRNA to locate the AUG start codon, and facilitate 60S subunit joining to form a translationally active 80S ribosome. (reviewed in Jackson et al., 2010). The cap structure is recognized by a complex that includes the cap-binding protein (eIF4E), a scaffold protein (eIF4G), and an RNA helicase (eIF4A), known as the eIF4F complex. The poly(A)-binding protein PABP bridges the 5' and 3' ends of the mRNA by binding to eIF4G and the poly(A) tail of the mRNA, conferring a closed-loop conformation to the mRNA, that increase translation efficiency (Kahvejian et al., 2001). The small inhibitory protein 4E-BP is in competition with eIF4G for the binding to eIF4E, on the same binding domain (YX₄LΦ) (Mader et al., 1995), inhibiting translation initiation. The binding of 4E-BP to eIF4E is regulated by mTOR phosphorylation. Cell proliferation is tightly regulated by translational control, and has been shown to involve the eIF4E-dependent translation of proto-oncogenes (Mamane et al., 2007a). Most of them have structured UTR regions that necessitate an efficient eIF4A helicase activity (Modelska et al., 2015). Besides, rapid proliferation often leads to hypoxia in the proliferative core (Brown and Giaccia, 1998). Furthermore, overexpression of translation factors lead to proliferation and cellular transformation. The eIF4F complex drives most of the translation initiation. In some specific physiological or physio-pathological cases, alternative cap-independent translation can occur in which non-canonical translation factors take control (Gebauer, 2012).

Sea urchin early development is a powerful model to study translational regulations and cell proliferation. Indeed, the first cell cycles of sea urchin embryo depend on translational regulations occurring at fertilization (Epel, 1967a; Wagenaar, 1983b). Besides, the sea urchin genome contains the full repertoire of the translation factors, each one encoded by a unique gene (Morales et al., 2006; Sodergren et al., 2006). In unfertilized eggs, translation activity is low. Fertilization triggers an increase in protein synthesis dependent upon the activation of the translation machinery and the polysomal recruitment of the stored maternal mRNAs, independently of transcription (Malkin et al., 1964; Davidson, 1986; Winkler et al., 1985). Work in our laboratory has highlighted the critical implication of the

initiation complex formation in the protein synthesis activation at fertilization. The cap-dependent translation inhibitor 4E-BP is rapidly phosphorylated and degraded following fertilization of sea urchin eggs leading to release of eIF4E in an mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin) dependent manner (Cormier et al., 2001; Salaun et al., 2003; Oulhen et al., 2009). eIF4E is then available to associate eIF4G (Oulhen et al., 2007). Therefore eIF4E is now recognized as a crucial actor for the onset of the first mitotic division following fertilization, suggesting that cap-dependent translation is highly regulated during this process (Gilbert, 2006).

The neosynthesized proteins may be masked by large amount of maternal proteins, or by a homeostatic state between proteins turn-over and synthesis and therefore proteins steady state level may appear unchanged (Roux et al., 2008). The study of the translational status of specific mRNAs by polysome gradient analysis allows to access directly to mRNAs encoding the neosynthesized subset of proteins. We analyzed whether fertilization impacts on eIF4F renewal or neosynthesis by polysome profiling. Strikingly, even if eIF4F coding mRNAs were present in the cells, they were not recruited into polysomes at fertilization, excepting eIF4B. Outstandingly, eIF4E1 mRNA was not present at all in the cells. These results led us to look at the presence and recruitment of other non-canonical initiation factors (eIF4E2, eIF4E3, DAP5 and hnRNP-Q), which were all recruited into polysomes at fertilization. The mTOR pathway was inhibited by PP242, and some translation factors escaped the general cap-dependent translation inhibition. Our data suggest that a network of translation factors regulation is initiated at fertilization in sea urchin.

Material and methods

Chemicals

PP242, puromycin and emetin were purchased from Sigma-Aldrich, France.

Handling and treatment of eggs and embryos

Paracentrotus lividus sea urchins were collected in the bay of Crozon (Brittany, France) and maintained in the CRBM facility of the Station Biologique de Roscoff. Gametes were obtained after intracœlomic injection of 1ml acetylcholine 0.1M. Unfertilized eggs were dejellied and rinsed before resuspension at 5% dilution in filtered sea water (FSW). Diluted sperm was added to the unfertilized eggs. Experiments were only performed on batches of embryos exhibiting >90% of fertilization rate. Each replicate of an experiment corresponds to

another couple of individuals. Embryos were collected for analyses at 60min post-fertilization. Drugs were added to the cells at different time points: PP242 [10 μ M] 10min before fertilization; puromycin [0.6mM] 40min post-fertilization and emetin [0.1mM] 55min post-fertilization.

Polysomal RNA preparation

1vol. of pelleted cells (often corresponding to 250 μ l) were lysed with a Dounce homogenizer in 4vol. of polysome lysis buffer (Tris pH7.4 10mM; KCl 250mM; MgCl₂ 10mM; EGTA 25mM; Igepal 0.4%; sucrose 5%; RNase-free water and extemporaneously DTT 1mM; Aprotinin 10 μ g/ml; Leupeptin 2 μ g/ml; Emetin 100 μ g/ml; RNase inhibitor 40U). Lysates were then clarified for 10min at 13,000 rpm in a table top centrifuge. Supernatants were loaded on a linear 15-40% sucrose gradient (Tris pH7.4 10mM; KCl 250mM; MgCl₂ 10mM; EGTA 25mM; DTT 1mM), which ran for 2.5h at 38,000 rpm in a SW41Ti rotor at 4°C. Gradients were fractionated into 21 equal fractions (~600 μ l per fraction).

RNA extraction and RT-PCR analysis

RNAs were extracted using acid phenol-chloroform (vol/vol), precipitated with isopropanol (vol/vol) and washed with 70° ethanol. RNA quality was checked on a 2% agarose/TBE gel electrophoresis (35min, 100V).

Reverse transcription (RT) were performed using the reverse transcriptase SuperScript II (Invitrogen), following the manufacturer instructions. The RTs were done using a constant volume of RNAs. cDNAs were diluted in RNase-free water (1vol. RT/300vol. H₂O). Gene amplifications were done using the GoTaq Flexi kit (Promega) and [5 μ M] primers (more information on the primers used in **Suppl. Fig. S1**). PCR were carried out using the following thermal profile: 95°C for 2min; followed by 30 cycles of 3 steps: 95°C for 30s, 60°C for 30s, 72°C for 1min; and finally 72°C for 5min. PCR products were analyzed after 2% agarose/TBE gels electrophoresis (20min, 100V). For each mRNA tested, a RT-PCR performed without reverse transcriptase was done in parallel to control for non-specific amplification. The agarose gels were scanned on a Typhoon Trio (GE Healthcare Life Sciences). Quantification was done using ImageJ software.

Results

mRNAs encoding initiation factors eIF4F other than eIF4B are not translationally regulated at sea urchin fertilization

An analysis of translated mRNAs at fertilization showed that few translation factors were actively recruited into polysomes following fertilization (Chassé et al., in prep. [Article 3]). Among the proteins implicated in the assembly of initiation factors on the cap structure of the mRNA, which is a key regulatory step of the initiation step of translation, eIF4B is the only initiation factor that is translated at fertilization. It should be emphasized that the translationalome analysis was designed to identify mRNAs associated to large polysomes, thereby masking more subtle differences in translation changes. Therefore we asked whether other initiation factors involved in translational machinery were also translationally regulated by analyzing the repartition of each mRNA along a sucrose gradient, which can reveal a shift from non-polysomal fractions to small polysomal fractions.

We first analyzed the presence of these messengers in sea urchin embryos cytoplasmic extracts one hour after fertilization by sqRT-PCR. We found that mRNAs encoding eIF4A, eIF4B, eIF4G, and PABP were present in our samples as maternally stored mRNAs (**Fig. 1A**). In contrast, eIF4E1 mRNA was not amplified from cytoplasmic RNAs of this early stage of development (**Fig. 1A**), although the primers designed were able to amplify efficiently eIF4E1 fragment in blastulae RNAs (not shown).

We then analyzed the repartition of these mRNAs along polysome gradients to attest of their translational status. Polysome gradients were performed on cytoplasmic extracts of unfertilized and fertilized eggs, and on eggs or embryos treated with puromycin (**Fig. 1B**). Puromycin, a specific polysome disrupter, mimics a stop codon and leads to disruption of ribosomes engaged into translation. In unfertilized eggs, the mRNAs were present mostly on top of the gradient in fractions #3-5. In contrast to the strong polysomal recruitment of eIF4B previously shown (**Fig. 1B**), fertilization did not induce a striking change in the repartition of eIF4A, eIF4G and PABP mRNAs in the sucrose gradient. However we noticed a reproducible small increase in fraction #17-19, which is displaced by puromycin treatment, indicating that a basal production of these proteins might be ongoing after fertilization.

A mathematical model of protein synthesis regulation at fertilization in sea urchin showed that an important fold-change activation of the degradation mechanism of 4E-BP

protein was necessary to fit experimental data (Laurent et al., 2014), however no data was available for the translation rates of 4E-BP protein. We therefore asked whether the mRNA encoding 4E-BP was associated to translating polysomes. 4E-BP mRNA is present in the maternal stock (**Fig. 1A**). Analysis of the mRNA repartition on sucrose gradient showed a small but significant difference in polysomal fractions between fertilized and puromycin-treated embryos (**Fig. 1B**). Interestingly, the small quantity of 4E-BP mRNA present in the heaviest fractions in unfertilized eggs was insensitive to puromycin treatment. This observation suggests that 4E-BP mRNAs were preloaded in inactive polysomes before fertilization, and that fertilization triggers the activation of stalled polysomes.

Taken together, these results demonstrated mRNAs encoding initiation factors eIF4F other than eIF4B were not efficiently recruited into polysome at fertilization.

Non-canonical eIF4F complex mRNAs are present in unfertilized eggs and translated at fertilization

An eIF4E protein is present in the unfertilized egg as revealed by western blot using an antibody directed to the human full-length protein on m7-GTP column, revealing the cap-binding protein (Salaun et al., 2003). eIF4E family is composed of three classes of genes, eIF4E1, eIF4E2 and eIF4E3 (**Table. I**), sharing ~30% identity (Joshi et al., 2004a). eIF4E1 is the canonical cap-binding protein implicated in translation initiation, whereas eIF4E2 and eIF4E3 are involved in mRNA-specific translation regulation (Landon et al., 2014; Morita et al., 2012; Osborne et al., 2013; Uniacke et al., 2012). The genes encoding the three proteins exist in the *S. purpuratus* genome (Morales 2006). The mRNAs for eIF4E2 and eIF4E3 were present in the maternal stock, as revealed by sqRT-PCR amplifications (**Fig. 2A**), in contrast to eIF4E1 mRNA that was undetectable. We then analyzed the repartition of these mRNAs in polysome gradients. Before fertilization, mRNAs sedimented in the top fractions of the gradient, and after fertilization shifted towards the bottom fractions. For eIF4E2, the mRNA was present in fractions #15 to 21, and was displaced when embryos were treated with puromycin. For eIF4E3, the mRNAs were associated to lighter fractions, peaking at fraction #15, and were also displaced by puromycin treatment. These data demonstrated that the two other members of the eIF4E family, namely eIF4E2 and eIF4E3 were translated at fertilization (**Fig. 2B**). This unusual repartition in light polysomes of eIF4E2 and eIF4E3 mRNAs along the sucrose gradient, compared to eIF4B mRNA, explained that they were not selected by RNA-Seq analysis of pooled heavy polysomes (Chassé et al., in prep [article 3]).

DAP5, a truncated homolog of eIF4G unable to interact with eIF4E, can mediate IRES-driven translation, for itself (Henis-Korenblit et al., 2000) as well as for the translation of a subset of mRNAs (Lieberman et al., 2015; Marash et al., 2008) (Marash and Kimchi, 2005) in particular conditions : viral infections, cellular stress, apoptosis or mitosis. Interestingly we have shown that DAP5 is strongly recruited into polysomes at fertilization (Chassé et al., in prep [article 3]). The fact that three non-canonical initiation factors (DAP5, eIF4E2 and eIF4E3) were translated at fertilization whereas their canonical counterpart were not, prompted us to also analyze the translational status of hnRNP-Q, a competitor of PABP (**Table. I**). The competitive function of hnRNP-Q with PABP for the binding of poly(A) tail has recently been shown (Svitkin et al., 2013). hnRNP-Q impairs eIF4E cap-binding activity and translation initiation, while regulating IRES-driven translation (Kim et al., 2012; Svitkin et al., 2013). As shown in **Fig. 2A**, hnRNP-Q mRNA was detected in maternal stocks by sqRT-PCR. Repartition of the mRNA showed that it was recruited into heavy fractions of the gradient after fertilization, and it was displaced by puromycin treatment, indicating that hnRNP-Q was actively translated at fertilization.

Altogether, among the maternally stored mRNAs in sea urchin eggs, we demonstrated that eIF4B, eIF4E2, eIF4E3, DAP5 and hnRNP-Q mRNAs were recruited into polysomes and translated after fertilization, whereas mRNAs coding for other initiation factors of the eIF4F complex were not.

mTOR pathway differentially impacts the polysomal recruitment of eIF4F complex mRNAs

The mTOR pathway regulates cap-dependent translation (Jackson et al., 2010a). In sea urchin, inhibition of the mTOR pathway by rapamycin or PP242 ((Salaun et al., 2003) and Chassé et al. [article 2]) inhibits 4E-BP degradation and the increase of translation triggered by fertilization. In order to study the implication of the mTOR pathway on the polysomal recruitment of the translation factors described above, we used the mTOR active site inhibitor PP242 on embryos. In parallel, to determine if the translation was fully inhibited or not with PP242 treatment, puromycin was also added to PP242 in embryo cultures. We previously showed that mRNAs entering polysomes at fertilization were not all impacted in the same way by mTOR inhibition. DAP5 mRNA repartition in a polysome gradient was similar in PP242-treated embryos and in control embryos; whereas part of eIF4B mRNA was released from polysomes upon PP242 treatment (**Fig. 3**; Chassé et al. in prep [article 3]).

In contrast, eIF4E2, eIF4E3 and hnRNP-Q mRNAs entry into polysomes at fertilization was completely abolished by PP242 treatment. The polysomal repartition of these mRNAs was similar in PP242-treated embryos and in embryos treated with both PP242 and puromycin, indicating that all mRNAs were released from polysomes.

Because the amount of 4E-BP protein was higher in PP242-treated embryos compared to control embryos, we next asked whether mTOR inhibition would also impact 4E-BP translation. The polysome profile of 4E-BP mRNAs showed that there was no increase of 4E-BP mRNAs level into polysomal fractions. This observation ruled out a possible contribution of newly translated protein to this net protein level increase, in addition to the already demonstrated impact on degradation rates (Laurent et al., 2014; Salaun et al., 2003)

Discussion

Protein synthesis regulation at fertilization is controlled by the formation of the eIF4F complex formation (Cormier et al., 2001; Salaun et al., 2003). The initiation factor eIF4E, the scaffolding protein eIF4G and the 4E binding protein 4E-BP are present as maternal proteins in sea urchin eggs before and after fertilization (Oulhen et al., 2007; Salaun et al., 2003). When embryos were treated with emetine, a general protein synthesis inhibitor, the amount of the above proteins was not significantly modified, suggesting that these proteins have a slow turn-over (not shown). We showed in this report that the mRNAs coding these proteins were not translated after fertilization, as well as eIF4A and PABP mRNAs. On the other hand eIF4B, which modulates eIF4A activity, was translated, suggesting that the unwinding activity of the eIF4F complex could be activated after fertilization. Furthermore non-canonical eIFs were translationally regulated at fertilization, such as eIF4E2, eIF4E3, DAP5 and hnRNP-Q. Unfortunately, no cross-reacting antibodies with the sea urchin proteins were available, therefore it was not possible to study the presence/accumulation of the proteins for which we have shown a translational regulation. Our polysomal data suggest that the stored maternal initiation factors drive protein synthesis initiation for the first cell cycles, and non-canonical initiation factors that are translated after fertilization may have a specific role later in the development.

eIF4E1 has non-canonical counterparts that can be used in place of the canonical proteins. eIF4E1 has been found in all eukaryotes; eIF4E2 in all metazoans; and eIF4E3 in deuterostomes (Joshi et al., 2004a; Joshi et al., 2005), including sea urchin (Morales et al., 2006). eIF4E2 and eIF4E3 are implicated in selective translation (Landon et al., 2014; Morita

et al., 2012; Osborne et al., 2013; Uniacke et al., 2012)), rather than in global translation which is driven by eIF4E1. During embryonic development in mice, drosophila and *C. elegans*, eIF4E2 acts as a selective translational repressor replacing eIF4E1 in eIF4F complex (Cho et al., 2006; Dinkova et al., 2005; Morita et al., 2012). In our experiments, we observed the neosynthesis of eIF4E2, suggesting a similar role of selective translation in sea urchin.

In metazoan early development in general, and in sea urchin early development in particular, a redox gradient is responsible of the oral-aboral axis specification of the embryo (Coffman and Denegre, 2007; Coffman et al., 2004). A spatial arrangement of mitochondria in the embryo confers an asymmetric distribution of oxygen availability and renders some embryonic regions hypoxic. eIF4E2 is able to drive protein synthesis in hypoxic conditions, when it associates to HIF2 α and RBM4 to select the proper mRNAs to translate (Uniacke et al., 2012). Although hypoxia induces 4E-BP reappearance in sea urchin (Le Bouffant et al., 2006), eIF4E2 may still mediate translation because it does not efficiently bind 4E-BP (Joshi et al., 2004a; Joshi et al., 2005; Rom et al., 1998). Therefore, taken together, we suggest that newly translated eIF4E2 could be part of a regionalized non-canonical initiation complex and could drive spatial specific mRNA translation in hypoxic embryonic cells.

eIF4E3 was not previously identified as a developmental eIF4E. This initiation factor binds to the cap in an atypical manner and is unable to bind efficiently to eIF4G (Joshi et al., 2004a; Osborne et al., 2013). These features are responsible for the competition between eIF4E3 and eIF4E1 for eIF4E1-targeted mRNAs, and the down-regulation of their translation (Osborne et al., 2013). MNKs, the eIF4E1 kinases (Pyronnet et al., 1999b) regulated by the MAPK pathway, have a master role in the use of eIF4E1 or eIF4E3 to initiate translation (Landon et al., 2014). Inhibition of MNKs activity leads to an increase of eIF4E3 translation, and to the preferential use of eIF4E3 as initiation factor (Landon et al., 2014). In sea urchin early embryos, the MAPK pathway is physiologically inactivated at fertilization (Kumano et al., 2001), and is correlated to the translation of eIF4E3 mRNAs. Whether MAPK inactivation is directly involved in eIF4E3 polysomal recruitment and whether newly synthesized eIF4E3 is engaged into an initiation complex in sea urchin are yet unknown.

During mitosis, cap-independent translation through IRES-dependent initiation (Internal ribosome entry site) is enhanced while cap-dependent translation is repressed (Pyronnet et al., 2001b; Qin and Sarnow, 2004a). Interestingly, DAP5 was shown to be involved in IRES-mediated translation during mitosis (Lieberman et al., 2009; Marash et al.,

2008). hnRNP-Q regulates the translation of several cellular IRESs (Cho et al., 2007; Kim et al., 2012). Since we have shown that translation of some mRNAs was not impacted by the inhibition of cap-dependent translation by mTOR inhibitor PP242, we suggest that DAP5 and hnRNP Q could participate in IRES-dependent translation in sea urchin.

In summary, the non-canonical eIF4F members we identified as translationally regulated at sea urchin fertilization are all global protein synthesis repressors, and enhancers of selective translation. We suggest that those non-canonical eIFs could establish non-canonical translation initiation complexes enabling their translation selectivity. Moreover, our results also demonstrated that the polysomal recruitment of these mRNAs have different requirement for mTOR pathway, some being completely independent. These results highlight that the translation initiation complex might be more modular than previously thought in the early developmental stage of sea urchin.

References

- Brown, J. M. and Giaccia, A. J.** (1998). The Unique Physiology of Solid Tumors : Opportunities (and Problems) for Cancer Therapy. *Cancer Res.* **58**, 1408–1416.
- Cho, P. F., Gamberi, C., Cho-Park, Y. A., Cho-Park, I. B., Lasko, P. and Sonenberg, N.** (2006). Cap-Dependent Translational Inhibition Establishes Two Opposing Morphogen Gradients in *Drosophila* Embryos. *Curr. Biol.* **16**, 2035–2041.
- Cho, S., Park, S. M., Kim, T. D., Kim, J. H., Kim, K.-T. and Jang, S. K.** (2007). BiP internal ribosomal entry site activity is controlled by heat-induced interaction of NSAP1. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 368–383.
- Coffman, J. A. and Denegre, J. M.** (2007). Mitochondria, redox signaling and axis specification in metazoan embryos. *Dev. Biol.* **308**, 266–280.
- Coffman, J. A., McCarthy, J. J., Dickey-Sims, C. and Robertson, A. J.** (2004). Oral-aboral axis specification in the sea urchin embryo: II. Mitochondrial distribution and redox state contribute to establishing polarity in *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev. Biol.* **273**, 160–171.
- Cormier, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Sonenberg, N. and Belle, R.** (2001). eIF4E association with 4E-BP decreases rapidly following fertilization in sea urchin. *Dev Biol* **232**, 275–283.
- Davidson, E. H.** (1986). The nature and function of maternal transcripts. In *Gene activity in early development*, pp. 46–125. Academic Press.
- Dinkova, T. D., Keiper, B. D., Korneeva, N. L., Aamodt, E. J. and Rhoads, R. E.** (2005). Translation of a Small Subset of *Caenorhabditis elegans* mRNAs Is Dependent on a Specific Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Isoform. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 100–113.
- Epel, D.** (1967). Protein synthesis in sea urchin eggs: a “late” response to fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **57**, 899–906.
- Gebauer, F.** (2012). Versatility of the translational machinery during stress: changing partners to keep dancing. *Cell Res.* **22**, 1634–1636.
- Gilbert, S. F.** (2006). *Developmental Biology, Eighth Edition*. Sinauer Associates.
- Henis-Korenblit, S., Strumpf, N. L., Goldstaub, D. and Kimchi, A.** (2000). A novel form of DAP5 protein accumulates in apoptotic cells as a result of caspase cleavage and internal ribosome entry site-mediated translation. *Mol Cell Biol* **20**, 496–506.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. and Pestova, T. V** (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 113–127.
- Joshi, B., Cameron, A. and Jagus, R.** (2004). Characterization of mammalian eIF4E-family members. *Eur J Biochem* **271**, 2189–2203.
- Joshi, B., Lee, K., Maeder, D. L. and Jagus, R.** (2005). Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evol. Biol.* **5**, 48.

- Kahvejian, A., Roy, G. and Sonenberg, N.** (2001). The mRNA closed-loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **66**, 293–300.
- Kim, D.-Y., Kim, W., Lee, K.-H., Kim, S.-H., Lee, H.-R., Kim, H.-J., Jung, Y., Choi, J.-H. and Kim, K.-T.** (2012). hnRNP Q regulates translation of p53 in normal and stress conditions. *Cell Death Differ.* **20**, 226–234.
- Kumano, M., Carroll, D. J., Denu, J. M. and Foltz, K. R.** (2001). Calcium-Mediated Inactivation of the MAP Kinase Pathway in Sea Urchin Eggs at Fertilization. *Dev. Biol.* **236**, 244–257.
- Landon, A. L., Muniandy, P. A., Shetty, A. C., Lehrmann, E., Volpon, L., Houn, S., Zhang, Y., Dai, B., Peroutka, R., Mazan-Mamczarz, K., et al.** (2014). MNKs act as a regulatory switch for eIF4E1 and eIF4E3 driven mRNA translation in DLBCL. *Nat. Commun.* **5**, 5413.
- Laurent, S., Richard, A., Mulner-Lorillon, O., Morales, J., Flament, D., Glippa, V., Bourdon, J., Gosselin, P., Siegel, A., Cormier, P., et al.** (2014). Modelization of the regulation of protein synthesis following fertilization in sea urchin shows requirement of two processes: a destabilization of eIF4E:4E-BP complex and a great stimulation of the 4E-BP-degradation mechanism, both rapamycin-sensitive. *Front. Genet.* **5**, 1–10.
- Le Bouffant, R., Cormier, P., Mulner-lorillon, O. and Belle, R.** (2006). Hypoxia and DNA-damaging agent bleomycin both increase the cellular level of the protein 4E-BP. *J Cell Biochem* **99**, 126–132.
- Liberman, N., Marash, L. and Kimchi, A.** (2009). The translation initiation factor DAP5 is a regulator of cell survival during mitosis. *Cell Cycle* **8**, 204–209.
- Liberman, N., Gandin, V., Svitkin, Y. V., David, M., Virgili, G., Jaramillo, M., Holcik, M., Nagar, B., Kimchi, A. and Sonenberg, N.** (2015). DAP5 associates with eIF2 and eIF4AI to promote Internal Ribosome Entry Site driven translation. *Nucleic Acids Res.* **43**, 3764–3775.
- Mader, S., Lee, H., Pause, A. and Sonenberg, N.** (1995). The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol* **15**, 4990–4997.
- Malkin, L. I., Gross, P. R. and Romanoff, P.** (1964). Polyribosomal protein synthesis in fertilized sea urchin eggs: the effect of Actinomycin treatment. *Dev. Biol.* **10**, 378–394.
- Mamane, Y., Petroulakis, E., Martineau, Y., Sato, T. A., Larsson, O., Rajasekhar, V. K. and Sonenberg, N.** (2007). Epigenetic Activation of a Subset of mRNAs by eIF4E Explains Its Effects on Cell Proliferation. *PLoS One* **2**, e242.
- Marash, L. and Kimchi, A.** (2005). DAP5 and IRES-mediated translation during programmed cell death. *Cell Death Differ* **12**, 554–562.
- Marash, L., Liberman, N., Henis-Korenblit, S., Sivan, G., Reem, E., Elroy-Stein, O. and Kimchi, A.** (2008). DAP5 Promotes Cap-Independent Translation of Bcl-2 and CDK1 to Facilitate Cell Survival during Mitosis. *Mol. Cell* **30**, 447–459.
- Modelska, A., Turro, E., Russell, R., Beaton, J., Sbarrato, T., Spriggs, K., Miller, J., Gräf, S., Provenzano, E., Blows, F., et al.** (2015). The malignant phenotype in breast cancer is driven by eIF4A1-mediated changes in the translational landscape. 1–12.

- Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Cosson, B., Morin, E., Bellé, R., Bradham, C. A., Beane, W. S. and Cormier, P.** (2006). Translational control genes in the sea urchin genome. *Dev. Biol.* **300**, 293–307.
- Morita, M., Ler, L. W., Fabian, M. R., Siddiqui, N., Mullin, M., Henderson, V. C., Alain, T., Fonseca, B. D., Karashchuk, G., Bennett, C. F., et al.** (2012). A Novel 4EHP-GIGYF2 Translational Repressor Complex Is Essential for Mammalian Development. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 3585–3593.
- Osborne, M. J., Volpon, L., Kornblatt, J. A., Culjkovic-Kraljacic, B., Baguet, A. and Borden, K. L. B.** (2013). eIF4E3 acts as a tumor suppressor by utilizing an atypical mode of methyl-7-guanosine cap recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 3877–3882.
- Oulhen, N., Salaün, P., Cosson, B., Cormier, P. and Morales, J.** (2007). After fertilization of sea urchin eggs, eIF4G is post-translationally modified and associated with the cap-binding protein eIF4E. *J. Cell Sci.* **120**, 425–434.
- Oulhen, N., Boulben, S., Bidinosti, M., Morales, J., Cormier, P. and Cosson, B.** (2009). A variant mimicking hyperphosphorylated 4E-BP inhibits protein synthesis in a sea urchin cell-free, cap-dependent translation system. *PLoS One* **4**, e5070.
- Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A. C., Fukunaga, R., Hunter, T. and Sonenberg, N.** (1999). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *Embo J* **18**, 270–279.
- Pyronnet, S., Dostie, J. and Sonenberg, N.** (2001). Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes Dev.* **15**, 2083–2093.
- Qin, X. and Sarnow, P.** (2004). Preferential translation of internal ribosome entry site-containing mRNAs during the mitotic cycle in mammalian cells. *J Biol Chem* **279**, 13721–13728.
- Rom, E., Kim, H. C., Gingras, A. C., Marcotrigiano, J., Favre, D., Olsen, H., Burley, S. K. and Sonenberg, N.** (1998). Cloning and characterization of 4EHP, a novel mammalian eIF4E-related cap-binding protein. *J Biol Chem* **273**, 13104–13109.
- Roux, M. M., Radeke, M. J., Goel, M., Mushegian, A. and Foltz, K. R.** (2008). 2DE identification of proteins exhibiting turnover and phosphorylation dynamics during sea urchin egg activation. *Dev. Biol.* **313**, 630–647.
- Salaun, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Bellé, R., Sonenberg, N. and Cormier, P.** (2003). eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* **255**, 428–439.
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W. and Selbach, M.** (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337–342.
- Sodergren, E., Weinstock, G. M., Davidson, E. H., Cameron, R. A., Gibbs, R. a, Angerer, R. C., Angerer, L. M., Arnone, M. I., Burgess, D. R., Burke, R. D., et al.** (2006). The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* **314**, 941–952.
- Sonenberg, N. and Hinnebusch, A. G.** (2007). New Modes of Translational Control in Development, Behavior, and Disease. *Mol. Cell* **28**, 721–729.

- Svitkin, Y. V., Yanagiya, A., Karetnikov, A. E., Alain, T., Fabian, M. R., Khoutorsky, A., Perreault, S., Topisirovic, I. and Sonenberg, N.** (2013). Control of translation and miRNA-dependent repression by a novel poly(A) binding protein, hnRNP-Q. *PLoS Biol.* **11**, e1001564.
- Thompson, B., Wickens, M. and Kimble, J.** (2007). Translational control of development. In *Translational control in Biology and Medicine* (ed. Mathews, M. B., Sonenberg, N., and Hershey, J. W.), pp. 507–544. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Uniacke, J., Holterman, C. E., Lachance, G., Franovic, A., Jacob, M. D., Fabian, M. R., Payette, J., Holcik, M., Pause, A. and Lee, S.** (2012). An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery. *Nature* **486**, 126–9.
- Wagenaar, E. B.** (1983). The timing of synthesis of proteins required for mitosis in the cell cycle of the sea urchin embryo. *Exp Cell Res* **144**, 393–403.
- Winkler, M. M., Nelson, E. M., Lashbrook, C. and Hershey, J. W.** (1985). Multiple levels of regulation of protein synthesis at fertilization in sea urchin eggs. *Dev Biol* **107**, 290–300.

Figures and Table legends:

Figure. 1: Translational regulations of the eIF4F complex members at fertilization. (A) Presence in the cytoplasmic extract of the eIF4F complex mRNAs (black arrows point the amplified sequence, the grey arrow points the absence of the target, » point the primers dimers); (B) Repartition of the targeted messengers along the gradient, monitored by sqRT-PCR (n=5; UnF vs F: * pval<0.05).

Figure. 2: Translational regulations of the eIF4F complex noncanonical members at fertilization. (A) Presence in the cytoplasmic extract of non-canonical initiation factors mRNAs (black arrows point the amplified sequence, » point the primers dimers); (B) Repartition of the targeted messengers along the gradient, monitored by sqRT-PCR (n=5; UnF vs F: * pval<0.05; ** pval<0.01).

Figure. 3: mTOR impact on polysomal recruitment of translation initiation factors at fertilization. Repartition of the targeted messengers along the gradient, monitored by sqRT-PCR. Samples were treated or not with PP242 ± puromycin (n=5; F vs F+PP242: † pval<0.05; ‡ pval<0.01; F+PP242 vs F+PP242+puromycin: * pval<0.05; ** pval<0.01)

Table I: Comparison of the features of the canonical and non-canonical eIFs possibly involved in eIF4F complex formation.

Supplementary Table legend:

Table. S1: Primers information. (NB: As we did not succeed in eIF4E1 amplification in our samples, we used a blastulae cytoplasmic extract (later stage of development), to check the primers linearity.)

Figures

Figure. 1

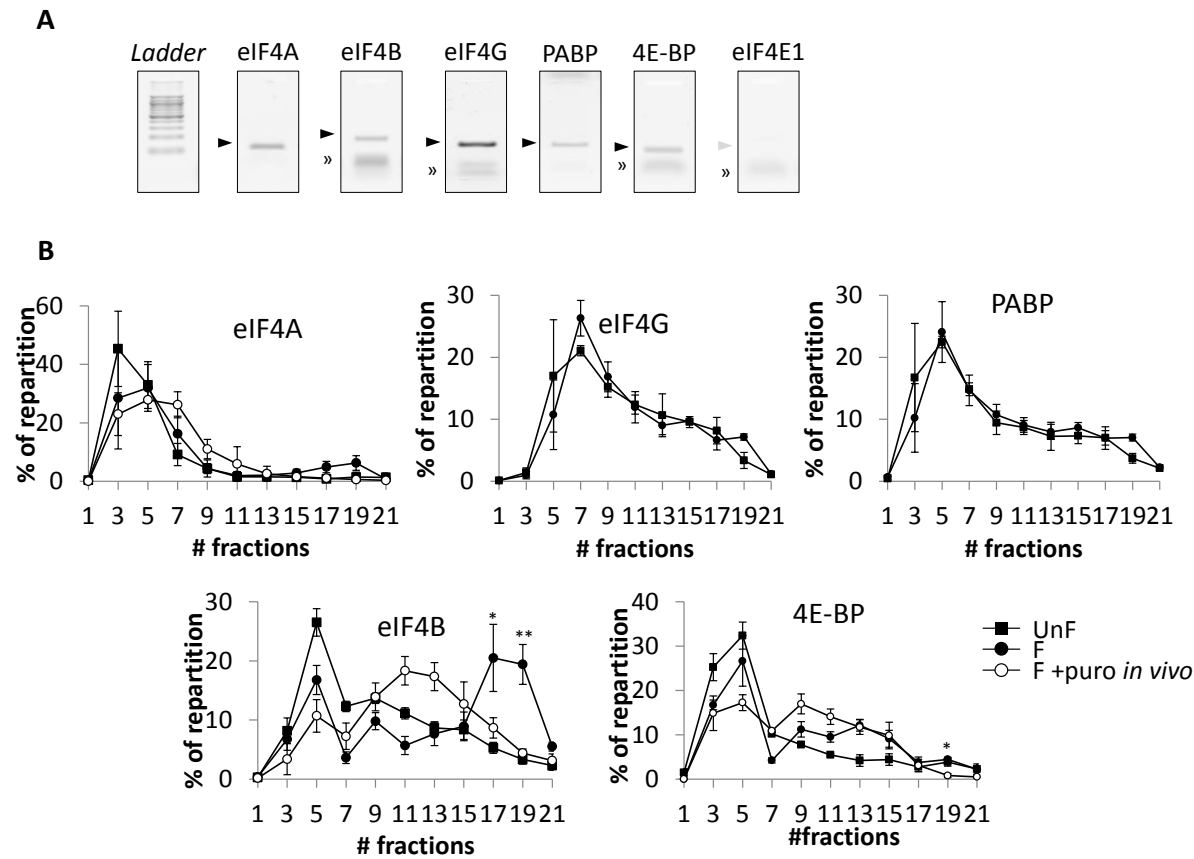


Figure. 2

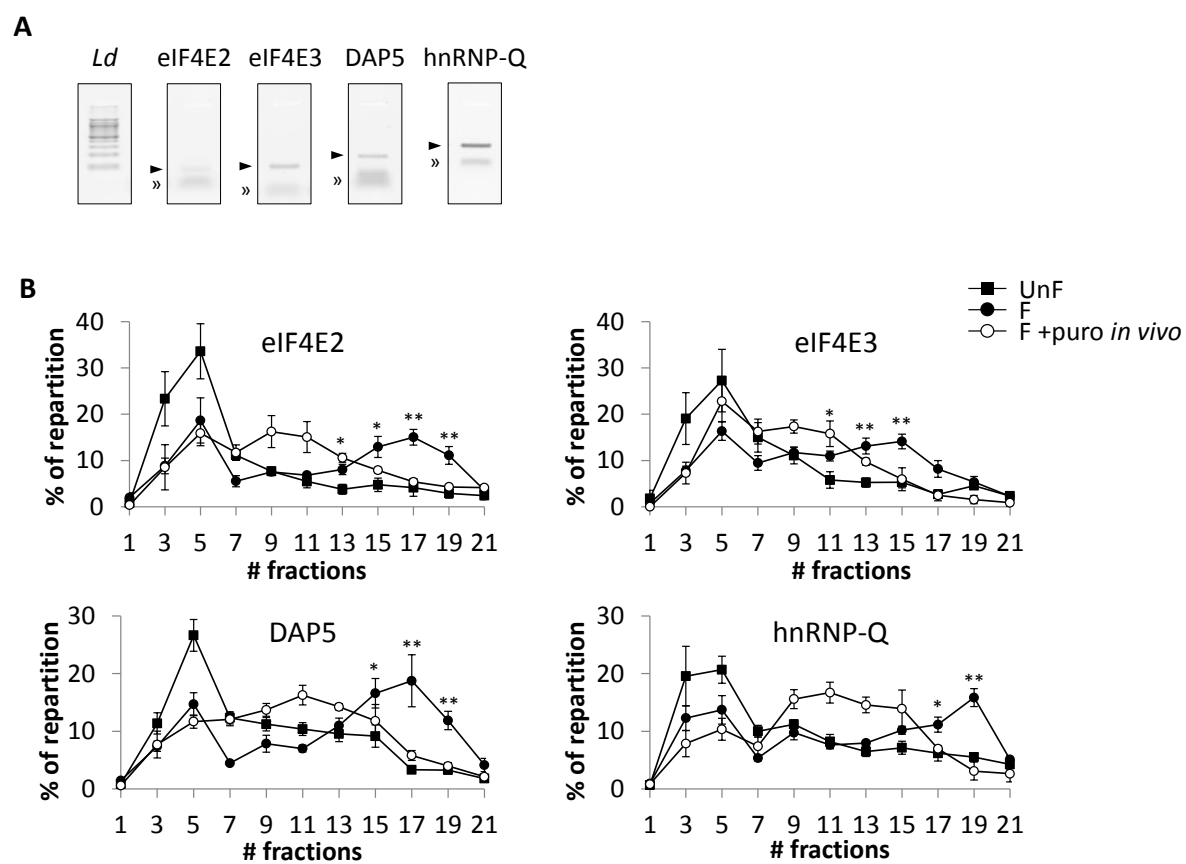


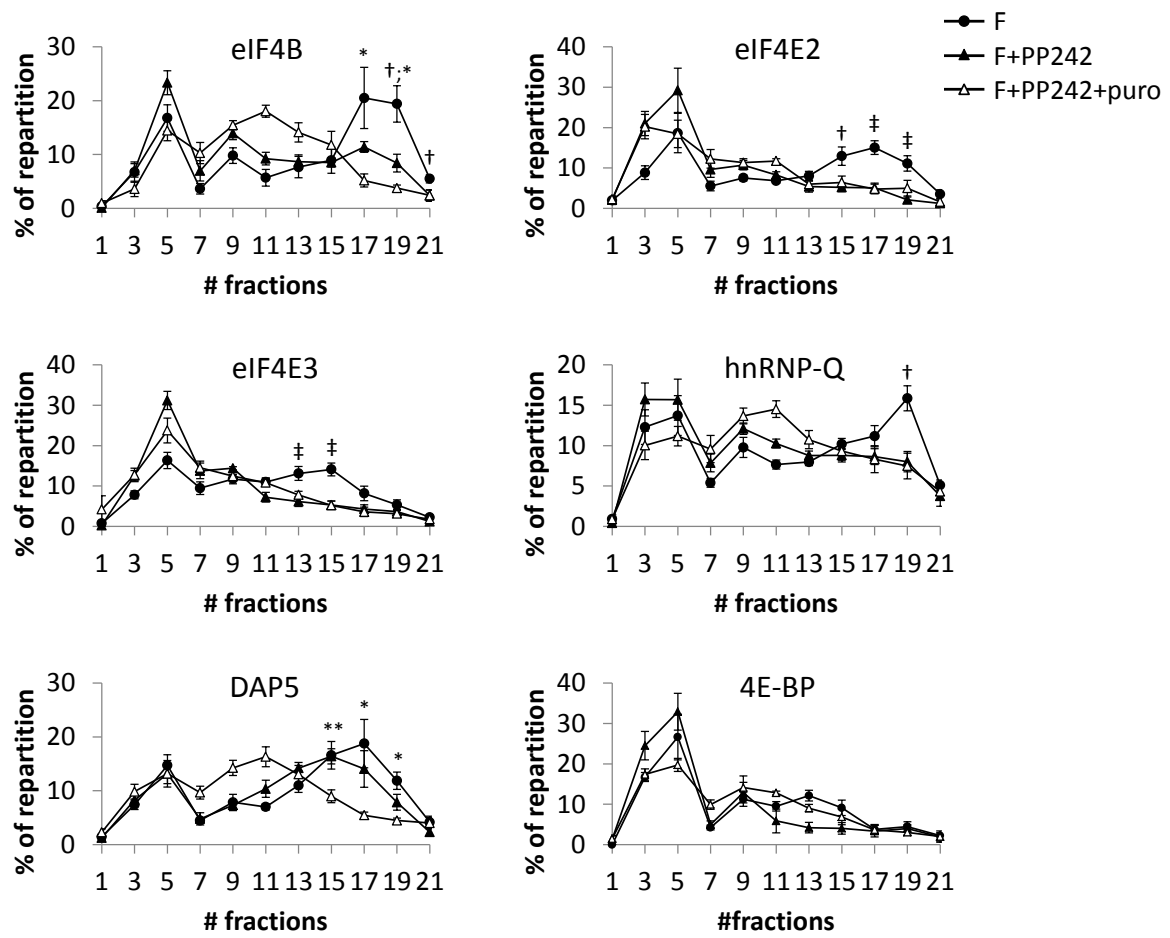
Figure. 3

Table. I

	<i>Gene</i>	<i>Interactions</i>			<i>Expression</i>	<i>Role</i>	<i>References</i>
		<i>Cap</i>	<i>eIF4G</i>	<i>4E-BP</i>			
Cap-binding protein	eIF4E1*	+++	+++	+++	Ubiquitous and continuous	Canonical eIF	Jackson et al., 2010
	eIF4E2	+	+	/	Hypoxia, stress, development	Selective translation	Morita et al., 2012 ; Uniacke et al., 2012
	eIF4E3	+	/	+	Tissue specific, apoptosis	Selective translation	Landon et al., 2014
Scaffolding protein		<i>eIF4E</i>	<i>PABP</i>	<i>Clivage</i>			
	eIF4G*	+++	+++	+++	Ubiquitous and continuous	Canonical eIF	Jackson et al., 2010
	DAP5	/	/	+	Apoptosis, stress, mitosis	Selective translation IRES regulation	Liberman et al., 2009, 2015
Poly(A) binding protein		<i>Poly(A)</i>	<i>eIF4G</i>				
	PABP*	+++	+++		Ubiquitous and continuous	Canonical eIF	Jackson et al., 2010
	hnRNP-Q	+	+++		Stress, G2/M	Selective translation IRES and miR regulation	Lee et al., 2012 ; Svitkin et al., 2013

Supplementary Table. SI

Gene	Sequences	Product length	Primers efficiency (R ²)
eIF4A	5'TGGTCAAGAAGGAAGAAC3' 5'CGTCTCATACAAGTCACA3'	103bp	0.990
eIF4B	5'GGAGGAGCAAAGCCTGTAGA3' 5'ACGCGTTCTGCTTTCTCTTC3'	200bp	0.992
eIF4E1	5'-GGTGGAAGGTGGCTCATAGG-3' 5'-TCTTTCCTCCAGTCCCCTGT-3'	191bp	0.996
eIF4E2	5'-TATGGTCGGAGAGGAGAT-3' 5'-ATTATTATCGCTGGCTGTG-3'	128bp	0.989
eIF4E3	5'-GTAAAGCCCCTATGGGAAGA-3' 5'-TTGGTGCCCCTAATGCTTAC-3'	185bp	0.996
eIF4G	5'-CCATGTTGAGTGAGGATGCG-3' 5'-ACCTTCTCCTGGGATCCTCT-3'	225bp	0.979
PABP	5'-GCACCTCAAGTTCGAGTTGG-3' 5'-TGGTCTGGAAGTTAGGCTGG-3'	201bp	0.992
4E-BP	5'-CCCATGATTACAGCACTAC-3' 5'-GGAAGTTACGGTCATAGATG-3'	83bp	0.996
DAP5	5'AGACGAGCAGGACCAGAGAG3' 5'GTCGGCCTACAGTGGTGATT3'	205bp	0.994
hnRNP-Q	5'-GAGGAGATGAACGGCAGAGA-3' 5'-GTAGCCTCCAAAGTCCCTGT-3'	230bp	0.999

Discussion

L'embryon d'oursin est un modèle puissant pour l'étude des relations entre traduction et cycle cellulaire. La hausse de synthèse protéique est indispensable à la reprise du cycle cellulaire (Wagenaar, 1983), et est basée sur l'utilisation des ARNm maternels stockés dans l'ovocyte, indépendamment de la transcription (Malkin et al., 1964). La reprise de l'activité traductionnelle est liée au démasquage des ARNm et à l'activation de la machinerie traductionnelle. La fécondation provoque une activation de la voie de signalisation mTOR, qui est à son tour responsable de l'activation du complexe eIF4F et de l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe. L'augmentation de la traduction a toujours été décrite comme liée à une augmentation générale du métabolisme. La traduction importante de messagers impliqués dans le cycle cellulaire et leur forte abondance ont alors été mis en corrélation.

La régulation traductionnelle est un processus fondamental de la régulation de l'expression des gènes. A la fécondation de l'embryon d'oursin, elle est responsable de l'augmentation de synthèse protéique nécessaire à l'entrée dans les premiers cycles cellulaires. L'objectif de ce travail de thèse a d'une part été d'identifier les messagers maternels recrutés dans les polysomes à la fécondation, et d'autre part, le but a été d'approfondir les connaissances des régulations traductionnelles permettant ce recrutement polysomal. Dans cette partie, je discuterai de la reprise de la traduction, de la signalisation en amont de celle-ci, et enfin de la sélectivité de la traduction observée.

1. Reprise de la traduction à la fécondation

A la fécondation d'un embryon, lors de l'OET, il y a une hausse de la synthèse protéique globale (Horner and Wolfner, 2008). Dans l'embryon d'oursin, l'incorporation de [³⁵S]-Met montre une augmentation générale de la quantité de protéines. L'augmentation du recrutement polysomal de certains messagers spécifiques du cycle cellulaire (les cyclines A et B, ou la petite sous-unité de la ribonucléotide réductase) à la fécondation a été démontrée (Kelso-Winemiller et al., 1993; Standart et al., 1985). Malgré ceci, la néosynthèse protéique dans les temps précoces ne présente pas de différence qualitative visible avant et après la

fécondation. Longtemps, cette observation a été expliquée comme étant le résultat d'un changement global de la disponibilité des ARNm maternels pour la machinerie traductionnelle, menant à une variation quantitative du recrutement polysomal plus que qualitative (Brandhorst, 1976; Roux et al., 2008).

L'augmentation de synthèse protéique à la fécondation de l'œuf d'oursin est à la fois due au démasquage des ARNm maternels (Kelso-Winemiller and Winkler, 1991) et à l'activation de la machinerie traductionnelle (Salaün et al., 2003; Winkler et al., 1985). Les variations de quantité d'une protéine ne sont pas toujours détectables par la biochimie ou la protéomique. La quantité protéique initiale peut être trop importante pour que les variations puissent être détectées, et/ou le taux de dégradation peut être équivalent au taux de néosynthèse, masquant les variations (Kronja et al., 2014b). D'autre part, les variations de quantités observées en électrophorèse bidimensionnelle peuvent être dues à une modification post-traductionnelle changeant le point isoélectrique, à une dégradation, ou à un changement de compartimentalisation (Roux et al., 2008). La traductomique est une alternative aux études protéomiques, permettant de clarifier ces biais expérimentaux (Kuersten et al., 2013). Le traitement des échantillons par la puromycine, drogue dissociant spécifiquement les ribosomes en cours d'élongation (Azzam and Algranati, 1973), permet de s'assurer de la réelle traduction active des transcrits.

1.1. Démasquage des ARNm maternels

Les ARNm masqués dans les œufs non-fécondés d'oursin sont associés à des protéines (formation de mRNPs) empêchant leur traduction avant la fécondation, et tendent à s'accumuler majoritairement à un coefficient de sédimentation de 60S (Davidson, 1986). Le crible du traductome présenté dans ce manuscrit de thèse (Article 3) a été effectué sur les fractions les plus lourdes du gradient de sucrose, correspondant à des niveaux de sédimentation bien supérieurs à 60S (*i.e.* fractions [5-7] vs [18-21]). Un changement de compartimentalisation tel que celui décrit par E. Davidson ne pouvait donc pas être observé dans nos conditions d'analyse.

Lorsque les échantillons sont préalablement traités à la puromycine, il y a toujours une petite fraction des ARNm qui n'est pas déplacée. Ceci suggère l'existence de mRNPs constitutifs, plus lourds que ceux décrits par E. Davidson, ce qui est notamment le cas chez l'espèce américaine *S. purpuratus* (Kelso-Winemiller and Winkler, 1991).

Les messagers maternels présents dans des mRNPs qui co-migrent avec les polysomes dans les œufs non-fécondés de *S. purpuratus* sont libérés à la fécondation pour entrer dans les polysomes (Kelso-Winemiller and Winkler, 1991), il s'agit de messagers « masqués ». L'analyse du traductome de *P. lividus* (Article 3), a également permis d'identifier des messagers dont le statut est masqué par leur association à des mRNPs très lourds. Ces transcrits se décomposent en deux catégories en fonction de leur dynamique de (dé)recrutement, et en fonction de leur traduction spécifique dans l'un des deux états physiologiques (avant ou après la fécondation). Ainsi, nous démontrons que le recrutement d'un ARNm traduit dans les polysomes à la fécondation peut être caché s'il se trouvait dans des mRNPs lourds avant la fécondation ; inversement, le dérecrutement d'un ARNm traduit avant la fécondation peut être caché si l'ARNm en question entre dans des mRNPs à la fécondation. Le traitement à la puromycine permet donc de révéler son statut réel de traduction, et ainsi, de dévoiler son entrée ou sa sortie des polysomes à la fécondation.

1.1. Activation de la machinerie traductionnelle : 4E-BP : substrat de mTOR préférentiellement ciblé au cours du développement embryonnaire ?

La voie de signalisation mTOR est fortement impliquée dans la régulation traductionnelle, plus particulièrement dans la régulation de l'initiation dépendante de la coiffe (revu dans (Ma and Blenis, 2009)). Ce travail de thèse a permis la mise en évidence de la forte incidence de mTOR sur le recrutement des transcrits maternels dans les polysomes à la fécondation.

mTOR a deux cibles terminales principales : la protéine 4E-BP régulant l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe, et la kinase S6, impliquée dans la biogenèse des ribosomes (revu dans (Ma and Blenis, 2009)). Dans les cellules de mammifères, le traductome dépendant de la voie mTOR comporte majoritairement des ARNm TOP ou TOP-like, dont la plupart codent pour des protéines ribosomales (Fonseca et al., 2014; Thoreen et al., 2012). De manière intéressante, l'embryon précoce d'oursin se trouve physiologiquement dans un contexte où la voie de signalisation mTOR est activée par la fécondation, et dans lequel 4E-BP, l'un des deux substrats terminaux, est hyperphosphorylé et dégradé ((Cormier et al., 2001; Salaün et al., 2003) et Article 2). Cette dégradation donne lieu à l'activation du complexe eIF4F. En revanche, il n'a pas été détecté de variation de l'activité de la S6K à la fécondation de l'embryon d'oursin (Pelech et al., 1988).

Nos résultats démontrent que malgré le fait que des transcrits codant pour des protéines ribosomales aient été identifiés dans le transcriptome, aucun n'est recruté ni traduit à la fécondation (Article 3). Dans les modèles embryonnaires tels que la souris et la drosophile, plusieurs études ont mis en évidence l'absence de synthèse de protéines ribosomales lors de la maturation méiotique et lors de la transition ovocyte-embryon (Chen et al., 2011; Kronja et al., 2014a; Su et al., 2007), nos résultats sont en accord avec ces données. Chez la souris et la drosophile, l'absence de traduction des protéines ribosomales vient du fait que les transcrits sont dérecrutés ou préférentiellement dégradés ; nos résultats suggèrent un mécanisme différent chez l'oursin, car ces ARNm ne sont ni dégradés (pas de variation transcriptomique), ni dérecrutés ($\log_2FC_{NF} > \log_2FC_F$). De plus, il y a une très forte quantité de ribosomes inactifs aux stades précoces du développement embryonnaire : dans les œufs non-fécondés, moins de 1% des ribosomes sont engagés dans la traduction ; 2h après la fécondation il y en a 20% (Davidson, 1986). La quantité de ribosomes n'est donc absolument pas limitante pour la traduction. D'après ces résultats et les études mentionnées ci-dessus, il peut être envisagé que les phosphorylations de 4E-BP soient privilégiées au cours du développement embryonnaire précoce de l'oursin, au détriment de celle de la S6K, expliquant ainsi l'absence de synthèse des protéines ribosomales.

2. Existence d'une voie alternative de traduction ?

2.1. *La voie mTOR régule le recrutement des ARNm dans les polysomes de manière différentielle*

Dans les expériences d'incorporation de [³⁵S]-Met, l'inhibition de la voie de signalisation mTOR affecte l'augmentation de synthèse protéique de manière globale, sans différences qualitatives majeures (Articles 2 et 3). Cependant, bien que leur identité ne soit pas connue, on distingue des protéines dont l'accumulation est plus sensible que d'autres à l'inhibiteur de la voie mTOR (Articles 2 et 3).

Généralement l'initiation de la traduction est dépendante de la coiffe. Ainsi, lorsque 4E-BP séquestre eIF4E, la traduction dépendante de la coiffe est inhibée. Par extension, une inhibition de la voie mTOR provoquant le maintien de 4E-BP après la fécondation est souvent associée à une inhibition globale de la traduction dépendante de la coiffe.

En ciblant des transcrits recrutés dans les polysomes à la fécondation, nous avons démontré que la voie mTOR n'influe pas la traduction de tous les transcrits de manière équivalente.

L'étude de la dépendance de la traduction à la voie mTOR a été menée sur un échantillon de 19 ARNm identifiés comme traduits à la fécondation. Certains ARNm voient leur traduction complètement abolie par l'inhibition de la voie de signalisation, tandis que d'autres parviennent à maintenir tout ou partie de leur traduction (Articles 2 à 4 ; **Tableau II**). Il est intéressant de noter que parmi les 19 ARNm testés, la traduction de 4 ARNm (21%) est partiellement dépendante de la voie mTOR, et la traduction de 7 ARNm (37%) est complètement indépendante de cette voie. Il s'agit d'ailleurs de la première démonstration d'une traduction indépendante de la coiffe chez l'oursin.

Tableau II : Dépendances de la traduction à la voie mTOR et transcrits concernés.

<i>F</i>	Traduction		
<i>F + PP242</i>	Traduction ×	Traduction résiduelle	Traduction normale
<i>F + PP242 + puromycine</i>	Traduction ×	Traduction ×	Traduction ×
Dépendance de la traduction	mTOR	mTOR + Autre	Autre
<i>ARNm</i>	R2 Cyclin A eIF4E2 eIF4E3 hnRNP-Q Musashi CDC6 NGDN	Cyclin B eIF4B CDK1 RBM4	DAP5 CUGBP Geminin Sox B1 RKHD Gustavus Cdt1

Chez l'oursin, la traduction de certains transcrits maternels est complètement dépendante de l'activité de la voie mTOR (Articles 3 et 4 ; **Tableau. II**, première colonne), comme c'est le cas dans les ovocytes de souris (Chen et al., 2013). La très bonne conservation des gènes et des voies de signalisation entre l'oursin et les vertébrés (Morales et al., 2006; Sodergren et al., 2006), permet d'émettre l'hypothèse qu'il existe une régulation de la traduction par la voie mTOR similaire chez les deutérostomes et les vertébrés. Elle serait responsable de la régulation traductionnelle de transcrits indispensables au bon déroulement des premières étapes du développement embryonnaire. En revanche, chez l'oursin comme chez la souris, il n'y a à ce jour pas de données concernant la proportion du traductome dépendant de la voie mTOR au cours du développement embryonnaire précoce, ni d'information sur l'éventuelle conservation des cibles entre les deux espèces ou la présence de motifs *cis*-régulateurs particulièrement enrichis.

La traduction de certains transcrits n'est pas totalement bloquée par l'inhibition de mTOR (Articles 3 et 4 ; **Tableau. II**, deuxième et troisième colonnes). Ceci démontre que la traduction de certains messagers peut être initiée de façon alternative, indépendamment de l'activité de mTOR et de la disponibilité d'eIF4E1 avant même le premier cycle cellulaire. Dans cette catégorie, il semble y avoir deux sous-groupes distincts. Dans le premier sous-groupe, la traduction n'est absolument pas inhibée lorsque la voie de signalisation est inactivée ; tandis que dans le second sous-groupe, la traduction diminue, mais il reste des

ARNm engagés dans des polysomes actifs. En effet, pour ces ARNm, le traitement à la puromycine modifie davantage le profil de répartition des messagers que lors de la simple inhibition de mTOR. Cela démontre pour la première fois qu'il existe chez l'oursin un mécanisme permettant une initiation alternative à l'initiation dépendante de la coiffe, ou du moins que l'initiation peut être indépendante de la séquestration d'eIF4E, médiée par 4E-BP. La traduction de DAP5 illustre très bien cette hypothèse (Article 3 et 4), qui pourrait être vérifiée par la construction d'ARNm bicistroniques contenant les régions non-traduites de l'ARNm de DAP5 ; d'autant que chez le mammifère, il est établi que ce transcrit porte un IRES (Henis-Korenblit et al., 2000), voie alternative à l'initiation dépendante de la coiffe.

2.2. Y aurait-il une prise de relai de la voie MAPK pour pallier l'inhibition de la voie mTOR ?

Les voies de signalisation mTOR et MAPK interagissent fortement ensemble par l'intermédiaire de rétrocontrôles (Mendoza et al., 2011). Chez l'oursin, la fécondation provoque à la fois l'activation de la voie mTOR (Salaün et al., 2003) et une inhibition de la voie MAPK (Pelech et al., 1988). *A priori*, il n'y a donc pas de raison pour que ces rétrocontrôles aient lieu à ce stade précoce du développement. Dans les cellules de mammifères, l'inhibition pharmacologique de la voie mTOR est souvent corrélée à une activation de la voie MAPK (Albert et al., 2009; Carracedo et al., 2008; Hoang et al., 2012; Jahangiri and Weiss, 2013; Renshaw et al., 2013). A l'instar de ces études, nous avons testé cette hypothèse chez l'oursin, et démontré que la traduction résiduelle des ARNm existant en présence d'inhibiteur de la voie mTOR peut être inhibée par l'ajout supplémentaire d'un inhibiteur de la voie MAPK, tandis que l'inhibiteur de la voie MAPK seul n'a aucun effet sur le niveau de traduction des messagers testés (Article 3 et **Tableau III**). Ces résultats suggèrent qu'une inhibition de mTOR chez l'embryon précoce d'oursin conduise à l'activation de la voie MAPK, maintenant un taux de traduction basal de certains messagers. La complexité de régulations s'élève donc à un niveau supérieur avec une prise de relai par la voie MAPK lors d'une inhibition de la voie mTOR. Cette complexité observée en réponse à la fécondation chez l'oursin semble conservée dans les cellules cancéreuses de mammifères. L'oursin est donc un modèle particulièrement adapté pour étudier dans des conditions physiologiques cette régulation de la signalisation en amont des régulations traductionnelles et de l'entrée en cycle cellulaire.

Tableau III : Sensibilité de la traduction à la double inhibition mTOR/MAPK et transcrits concernés.

<i>F</i>	Traduction					
<i>F + U0126</i>	Traduction normale					
<i>F + PP242</i>	Traduction résiduelle			Traduction normale		
<i>F + PP242 + U0126</i>	Traduction résiduelle X	Traduction résiduelle	Traduction résiduelle	Traduction X	Traduction résiduelle	Traduction normale
<i>F + PP242 + U0126 + puromycine</i>	Traduction X					
<i>Dépendance de la traduction</i>	mTOR + Relai MAPK	mTOR + Relai MAPK + Autre	mTOR + Autre	Relai MAPK	Relai MAPK + Autre	Autre
<i>ARNm</i>	eIF4B	∅	∅	Cdt1 Sox B1 RKHD	DAP5	∅

3. La traduction à la fécondation est sélective

Nous sommes parties du postulat que parmi les ARNm fortement recrutés à la fécondation codent des protéines dont la fonction est nécessaire à la reprise du cycle, comme c'est le cas des Cyclines (Evans et al., 1983; Kelso-Winemiller et al., 1993) et/ou au bon déroulement des étapes précoces du développement embryonnaire. Pour l'analyse du traductome, nous avons préférentiellement ciblé les messagers les plus fortement recrutés dans les polysomes lourds (fractions [18-21]) lors de la fécondation. Cependant, certains messagers peuvent être traduits dans des polysomes plus légers, auquel cas, ils n'ont pas été identifiés comme étant traduits dans cette étude. C'est la raison pour laquelle eIF4E3 n'apparaît pas comme recruté et traduit dans les résultats du traductome (Article 3), mais apparaît comme tel dans l'étude des régulations traductionnelles que subit le complexe d'initiation (Article 4), lorsque l'on analyse la répartition le long d'un gradient de polysome.

Chaque messager testé présente systématiquement un déplacement d'au moins 5% de sa quantité vers le compartiment polysomal à la fécondation, et varie en fonction des ARNm. Contrairement à ce qui est classiquement admis, la quantité de messager n'est pas corrélée à son niveau de traduction (Article 3). Un messager extrêmement abondant peut ne pas être traduit du tout, c'est notamment le cas de la métallothionéine 1 ($MT1_{\text{FPKM}} \approx 1\,200$) ; *a contrario*, un messager plus rare peut être très fortement recruté et traduit, comme dans le cas de la neuroguidin ($NGDN_{\text{FPKM}} \approx 5$) (Article 3). Cependant, à un niveau de recrutement équivalent, un ARNm abondant produira une quantité plus importante de protéines qu'un ARNm peu représenté.

Au sein des ARNm maternels stockés et aux seuils que nous nous sommes fixés, seuls ~20% des messagers maternels sont fortement recrutés et traduits à la fécondation (Article 3). Il y a donc une sélectivité lors de l'augmentation de traduction à la fécondation, ce qui contraste avec la vision classique d'une augmentation globale et homogène de la synthèse protéique (Brandhorst, 1976). A la lumière de ces résultats, nous pouvons affirmer que l'augmentation de synthèse protéique à la fécondation est la combinaison d'une augmentation légère de synthèse au niveau global, et d'une augmentation sélective très forte. Par la suite, il sera important d'étudier la présence d'éventuels motifs *cis*-régulateurs qui pourraient être

responsables du recrutement préférentiel de certains ARNm maternels, comme c'est le cas des motifs CPE chez le Xénope (revu dans (Radford et al., 2008)).

Quelques études ont précédemment établi l'existence d'une forte néosynthèse ou d'une accumulation de protéines du cycle (Cyclines A/B, R2) ou de déterminants maternels (SoxB1, Gustavus) à la fécondation (Evans et al., 1983; Gustafson et al., 2011; Kelso-Winemiller et al., 1993; Kenny et al., 1999; Le Breton et al., 2003; Standart et al., 1985). Ces différents transcrits ont également été identifiés comme étant traductionnellement régulés dans le traductome (Article 3).

Le classement fonctionnel des ARNm traductionnellement régulés à la fécondation fait ressortir de manière significative un enrichissement de la catégorie des transcrits appartenant au « Cycle Cellulaire ». Ce classement indique également un enrichissement particulier de la catégorie « Signaling » et « RNA-Binding Protein » (RBP) (Article 3). Les RBP sont des protéines impliquées dans la régulation post-transcriptionnelle d'un ARNm portant un motif dont elles sont spécifiques. Elles agissent sur leurs cibles par des mécanismes répresseurs ou activateurs de la traduction, en formant des complexes ribonucléoprotéiques avec leur cible. La forte néosynthèse de multiples RBP à la fécondation suggère un rôle important lors du développement embryonnaire précoce. Cela a déjà été démontré dans d'autres espèces pour certaines d'entre elles (Musashi, RKHD et CUGBP) (Charlesworth et al., 2006; Draper et al., 1996; Graindorge et al., 2008; Takada et al., 2009).

Parmi les transcrits maternels sélectionnés pour la traduction, il y a un net enrichissement d'ARNm régulateurs, que ce soient des régulateurs du cycle cellulaire, de la traduction ou de la signalisation. Il existe de fortes variabilités interindividuelles dans le recrutement polysomal des ARNm. Cependant, pour certains transcrits il n'y en a aucune (ex : Cycline B, p_{val} et σ très faibles), comme s'il y avait des contraintes très fortes sur leur recrutement. Ces transcrits pourraient être déterminants, avec une forte conservation évolutive. A présent, l'enjeu majeur est d'identifier les mécanismes communs de régulation par la voie mTOR, d'identifier les éventuels motifs *cis*-régulateurs impliqués et d'effectuer des analyses fonctionnelles. L'analyse fonctionnelle valoriserait ces études, *a fortiori* si la traduction de l'un des transcrit identifié se révèle comme étant indispensable à la progression dans le développement, à condition que l'extinction de la traduction par morpholinos ne soit pas masquée par la présence maternelle de la protéine.

3.1. *La « signalisation » dans les starting-blocks ?*

La signalisation cellulaire permet à la cellule de percevoir et de répondre aux variations de son environnement de manière coordonnée. La réponse doit être rapide, efficace et adaptée. Une étude de la plasticité synaptique chez le rat a mis en évidence l'existence de polysomes qui débutent la phase d'élongation de la traduction dans le soma, puis qui sont bloqués et transportés aux synapses (Graber et al., 2013). Ces polysomes préchargés en ARNm donnent au neurone la capacité de réagir rapidement et spécifiquement à des stimuli, indépendamment de l'étape d'initiation de la traduction.

Les gènes impliqués dans la signalisation cellulaire sont conservés entre l'oursin et les vertébrés (Lapraz et al., 2006). Le classement fonctionnel des transcrits présents dans le traductome a permis de démontrer que la fécondation provoque un enrichissement de deux fois du recrutement des messagers de la catégorie « Signaling » (comprenant la signalisation par les RTK et le TGF- β) (Article 3). La signalisation médiée par le TGF- β est active lors de la mise en place de l'axe dorso-ventral qui implique des ALX (récepteurs aux TGF- β), des BMP (*Bone Morphogenetic Protein*), et des SMAD, tous néosynthétisés. De manière intéressante, le recrutement du tiers de ces transcrits est masqué car, avant la fécondation, ils sont associés à des mRNP lourds, co-migrant avec les polysomes. Une explication de ce résultat pourrait être que l'immobilisation des polysomes sur les ARNm de la catégorie « Signaling » démontrée chez les vertébrés (Graber et al., 2013) puisse également exister dans l'embryon d'oursin.

3.2. *La traduction de certains transcrits pourrait-elle être préférentiellement localisée ?*

Divers messagers sont localisés au fuseau mitotique à la fécondation chez la souris ou le Xénope (Blower et al., 2007; Chen et al., 2011; Romasko et al., 2013). Parmi ces messagers chez la souris, il y a notamment les transcrits des protéines de liaison à l'ARNm CUGBP et RKHD, et plusieurs régulateurs traductionnels (PAIP2, CPEB3, des CNOTs, eIF1, eIF1b, eIF5b ou encore eEF1E1) (Romasko et al., 2013). Cette localisation des ARNm maternels est associée à la présence de la forme phosphorylée de 4E-BP, et par extension, à une zone de traduction active. Une observation analogue de traduction localisée, cette fois médiée par la protéine Vasa, a également pu être faite dans l'embryon d'oursin au stade 4-cellules (Yajima and Wessel, 2015). Vasa est une hélicase de l'ARN spécifique des cellules germinales et des

cellules embryonnaires. Dans l'embryon d'oursin, elle permet une traduction localisée de la Cycline B. Ceci est en accord avec les résultats obtenus chez la souris concernant une possible localisation préférentielle au fuseau mitotique des ARNm recrutés dans les polysomes, en particulier ceux du cycle (Chen et al., 2011). Gustavus est une protéine qui lie la protéine Vasa, la rendant plus stable, et favorisant de ce fait son accumulation (Gustafson et al., 2011). L'importante traduction de Gustavus que nous avons observée (Article 3) pourrait ainsi être responsable du renforcement de la localisation de la traduction de Cycline B *via* Vasa. Si tel est le cas, l'immuno-marquage de Gustavus et de Vasa, associé à l'utilisation d'ARNt marqués (Barhoom et al., 2011), permettraient de valider cette hypothèse par la visualisation de la traduction localisée de la Cycline B.

3.3. *La régulation du cycle est-elle plus complexe que prévu ?*

Dans le traductome, nous montrons un enrichissement des transcrits impliqués dans le cycle cellulaire (Article 3), observation en accord avec les données obtenues chez la souris et la drosophile (Chen et al., 2011; Kronja et al., 2014b). Cette catégorie des messagers comprend les Cyclines A/B, la petite sous-unité R2 de la ribonucléotide réductase, et Geminin dont le recrutement polysomal et/ou l'accumulation protéique a (ont) été démontré(e)(s) (Aze et al., 2010; Evans et al., 1983; Kelso-Winemiller et al., 1993; Standart et al., 1985). La protéine CDK1 est l'effecteur du complexe CDK1/Cyclines A/B, et son transcrit fait partie de ceux qui sont fortement recrutés à la fécondation (Article 3). La protéine est maternellement présente, stockée sous forme phosphorylée inactive jusqu'à sa déphosphorylation par la phosphatase CDC25. Classiquement, CDK1 est considéré comme invariante car la quantité nette de la protéine ne varie pas à la fécondation ((Meijer et al., 1989) et Article 2). Comme il a été mentionné précédemment, l'apparente contradiction entre les observations protéique et traductomique peut être la résultante d'une très forte présence de la protéine maternelle, masquant l'augmentation de synthèse à la fécondation et/ou d'un taux de dégradation équivalent au taux de synthèse. Néanmoins, cela reste la seule démonstration d'une régulation traductionnelle de CDK1. Si la protéine CDK1 néosynthétisée n'est pas phosphorylée, elle pourrait se complexer directement à la Cycline B, donnant lieu à un complexe instantanément actif, permettant d'amorcer une boucle d'auto-amplification du complexe CDK1/Cycline B.

L'accumulation de la Geminin à la fécondation (Aze et al., 2010) corrèle avec son recrutement polysomal (Article. 2). La Geminin est un inhibiteur de la formation du complexe

de pré-réplication de l'ADN qui s'associe à Cdt1. Le complexe de pré-réplication est entre autre formé par l'association de CDC6 et de Cdt1. CDC6 est un facteur d'initiation de la réplication contrôlé par les complexes Cyclines/CDKs, tandis que Cdt1 est un facteur de réplication de l'ADN. L'analyse du traductome a permis pour la première fois de montrer que Cdt1 et CDC6 sont également traductionnellement régulés. En revanche, la régulation traductionnelle diffère entre les trois messagers : la traduction de CDC6 est complètement dépendante de l'activité de la voie mTOR, tandis que celles de Cdt1 et de Geminin semblent indépendante de l'activité de la voie de signalisation (Article 3 ; **Tableau II**).

Les différences de régulation s'élèvent même à un niveau de complexité supérieur, puisque la double inhibition des voies mTOR et MAPK affecte les traductions de Cdt1 et de la Geminin (Article 3 ; **Tableau III**). En effet, la traduction résiduelle de Cdt1 observée malgré le traitement par un inhibiteur de la voie mTOR est totalement bloquée par l'ajout d'un inhibiteur de la voie MAPK. Nous suggérons qu'il y ait une prise de relai de la voie MAPK en cas d'inhibition de mTOR pour le contrôle traductionnel de Cdt1. Par ailleurs, la traduction de la Geminin qui n'est pas affectée lorsque seule la voie mTOR est inhibée, semble affectée de la même manière que DAP5 en cas de double inhibition (données non-présentées), suggérant qu'il y aurait d'une part une prise de relai de la voie MAPK en cas d'inhibition de la voie mTOR, et d'autre part l'intervention d'un autre mécanisme. L'étude des régulations traductionnelles de ces trois ARNm qui agissent en synergie, illustre le degré de complexité que peut mettre en place la cellule afin d'ajuster correctement les niveaux protéiques, pour une action coordonnée sur la formation du complexe de pré-réplication.

3.4. La dégradation des ARNm maternels est-elle en préparation dès la fécondation ?

La dégradation des ARNm maternels est essentielle au bon déroulement du développement embryonnaire (Tadros and Lipshitz, 2009). A la reprise efficace de la transcription lors de la transition blastula-gastrula, les ARNm maternels sont dégradés dans les cellules somatiques, alors qu'ils sont maintenus dans la lignée germinale (revu dans (Swartz and Wessel, 2015)).

La régulation post-transcriptionnelle dirigée par les miR est essentielle au développement embryonnaire de l'oursin (Song et al., 2012). L'extinction de l'expression des gènes médiée par les miR donne souvent lieu à une déadénylation des transcrits (revu dans

(Izaurrealde, 2015)), faisant intervenir chez l'oursin les nucléases CNOT6 et CCR4 dans les cellules somatiques (Swartz et al., 2014) maternellement présentes, ou synthétisées plus tardivement.

Le facteur de transcription SoxB1 est impliqué dans le développement embryonnaire tardif (gastrulation, différenciation des tissus embryonnaires, mise en place de l'axe dorso-ventral) (Kenny et al., 2003). Son recrutement polysomal semble relativement précoce (Article 3) par rapport à cette fonction. Chez le poisson zèbre, SoxB1 fait partie des ARNm maternels les plus précocement traduits et est impliqué avec deux autres protéines (Nanog et Pou5f1) dans la dégradation des ARNm maternels *via* les miR lors de la MZT (Giraldez et al., 2006; Lee et al., 2013). Une possibilité serait que SoxB1 agisse également sur la dégradation des transcrits maternels dans l'embryon d'oursin, par un mécanisme similaire à celui du poisson zèbre.

La protéine CUGBP (CUG-Binding Protein homologue de EDEN-BP pour *Embryonic Deadenylation Element-Binding Protein* chez le Xénope, ou de CELF1 pour *CUGBP, Elav-Like Family member 1* chez l'humain), fait partie des RBP les plus fortement recrutées à la fécondation de l'embryon d'oursin. L'un des rôles de la protéine CUGBP est de reconnaître un motif de déadénylation en *cis* de ses cibles (Graindorge et al., 2008). De plus, dans les cellules de mammifères, CUGBP recrute directement la déadénylase PARN (Moraes et al., 2006). Ainsi, il est possible CUGBP recrute PARN dans l'embryon d'oursin, comme c'est le cas chez les mammifères, et qu'elle soit impliquée dans la déadénylation et la dégradation des ARNm maternels comme CCR4 et CNOT6.

Dans l'embryon d'oursin, la polyadénylation des messagers n'est pas nécessaire à la traduction précoce des ARNm maternels (Fromson and Duchastel, 1975), qui seront dégradés à la blastula par des mécanismes impliquant la déadénylation (Song et al., 2012; Swartz et al., 2014). De manière intéressante, plusieurs ARNm codant pour des protéines du système de déadénylation sont néotraduites dès la fécondation (Article. 3). Conjointement, ces résultats suggèrent que le système de déadénylation se mette en place précocement afin de promouvoir plus tardivement la dégradation des ARNm maternels.

3.5. Et la machinerie traductionnelle dans tout ça ?

Malgré une régulation traductionnelle très importante à la fécondation, très peu de transcrits codant pour des facteurs d'initiation passent les seuils fixés pour l'analyse du traductome (Article 3), allant même jusqu'à une absence totale à ce stade de développement du transcrit d'eIF4E1, codant la protéine canonique de liaison à la coiffe. Cependant, l'analyse des fractions individuelles du gradient met en évidence que plusieurs transcrits de facteurs d'initiation, canoniques ou non, ayant chacun leurs spécificités (**Figure. 34**) sont activement recrutés dans les polysomes à la fécondation (Article 4).

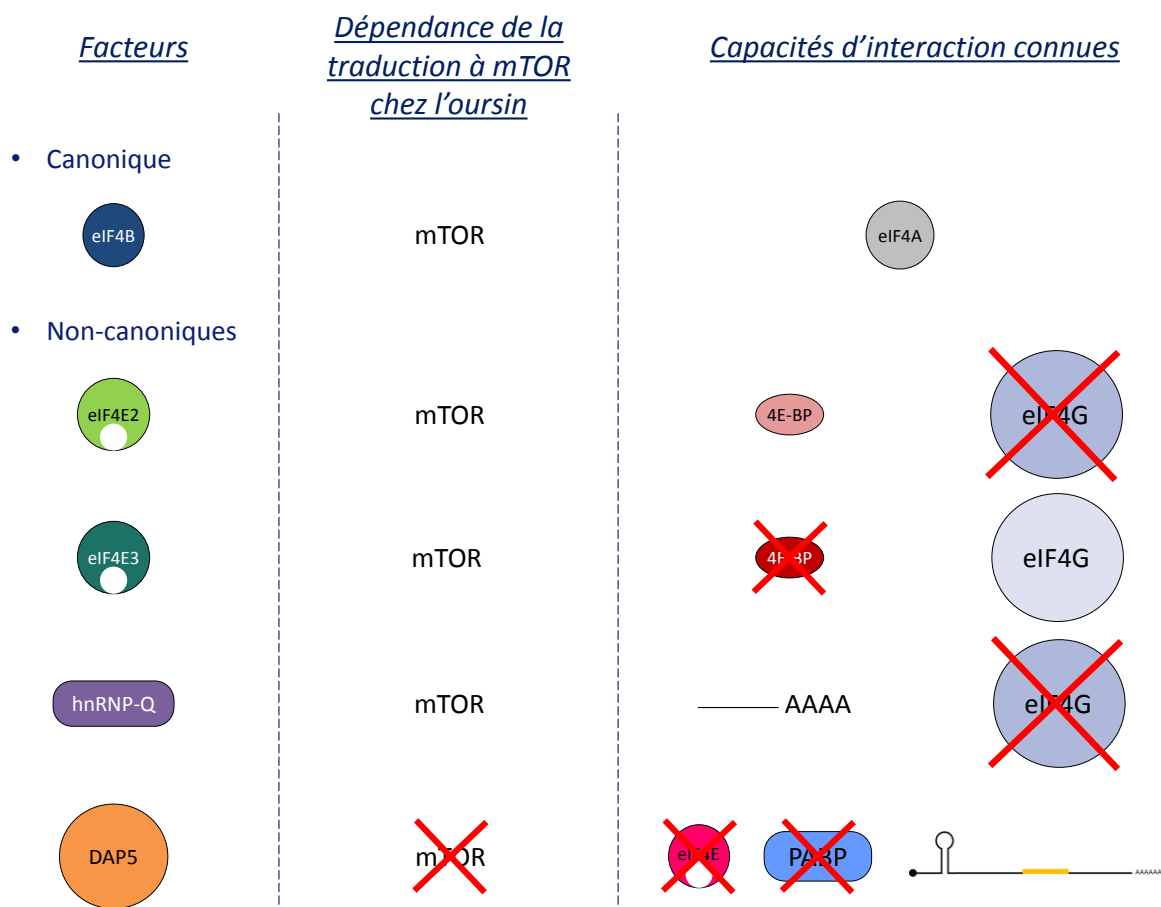


Figure. 34 : Particularités des facteurs de traduction néosynthétisés à la fécondation. La première colonne indique le facteur considéré, la deuxième colonne indique la sensibilité de sa traduction à la voie mTOR chez l'oursin, et la dernière colonne ses interactions connues : eIF4E2 lie faiblement 4E-BP et pas eIF4G ; eIF4E3 ne lie pas 4E-BP et faiblement eIF4G ; hnRNP-Q lie la queue poly(A) mais pas eIF4G ; et enfin DAP5 ne lie ni eIF4E1, ni PABP, mais en revanche s'associe aux IRES.

La néotraduction de facteurs de traduction non-canoniques observée (eIF4E2/3, DAP5, hnRNP-Q) en amont de la première division, suggère une mise en place de complexes d'initiation alternatifs intervenant dans la sélection des messagers maternels traduits au cours des cycles suivants. Le maintien de la complexité des régulations traductionnelles démontre que les régulations traductionnelles jouent un rôle majeur dans l'homéostasie cellulaire, tout au long du développement. Les hypothèses quant à leur utilisation dans des complexes d'initiation alternatifs sont présentées ci-dessous.

3.5.1. Préparer l'hypoxie à venir ?

La protéine RBM4 fait partie des RBP précocement recrutées dans les polysomes (Article 3). En cas d'hypoxie dans les cellules de mammifères, RBM4 s'associe à HIF-2 α (facteur induit par l'hypoxie) et à eIF4E2 (protéine de liaison à la coiffe spécifique de l'hypoxie) pour former un complexe d'initiation non-canonique (Uniacke et al., 2012). L'hypoxie étant un stress auquel la cellule doit pouvoir faire face, il existe des moyens de réponse pour pallier l'inhibition de traduction induite par le manque d'oxygène. RBM4 est un facteur essentiel de la réponse traductionnelle à l'hypoxie car dans ce complexe alternatif, elle est seule à reconnaître les motifs HRE. Les ARNm ciblés par ce complexe alternatif illustrent la traduction spécifique ayant lieu dans la cellule en réponse à l'hypoxie.

La capacité de réponse de l'embryon d'oursin au stress hypoxique (Le Bouffant et al., 2006) est nécessaire au cours du développement embryonnaire, car les cellules sont soumises à un gradient de disponibilité en oxygène, essentiel à la mise en place de l'axe oral-aboral (Coffman et al., 2004). Or, nos résultats démontrent que RBM4 et eIF4E2 sont tous deux recrutés dans les polysomes à la fécondation (Articles 3 et 4). Nous nous sommes intéressées au troisième partenaire du complexe d'initiation hypoxique, HIF-2 α . Il n'apparaît pas comme entrant significativement dans les polysomes à la fécondation, mais il est traduit constitutivement avant et après la fécondation. Il est donc possible qu'à l'instar des cellules de mammifères, ces protéines néosynthétisées forment un complexe d'initiation particulier, adapté à la condition hypoxique, et permettant la traduction spécifique d'ARNm dans la partie aborale (**Figure. 35**).

3.5.2. Un complexe d'initiation spécifique du développement embryonnaire précoce ?

L'eIF4E3 de mammifère et l'eIF4E3 d'oursin (*S. purpuratus* comme *P. lividus*) sont conservés, en particulier sur les résidus responsables de la liaison atypique de cet eIF4E à la coiffe m⁷-GTP, notamment les résidus alkyles (Article 3 et (Morales et al., 2006; Osborne et al., 2013)). Récemment, dans les cellules de mammifères, l'augmentation de traduction d'eIF4E3 d'une part, et son recrutement préférentiel au sein de complexes d'initiation non-canoniques d'autre part, ont été démontrés lorsque l'une des kinases terminales de la voie MAPK est inactivée (Landon et al., 2014). Cette caractéristique est extrêmement intéressante lorsqu'elle est mise en regard de nos résultats puisque, physiologiquement, la voie MAPK est inactivée à la fécondation et la traduction d'eIF4E3 augmente (Article 4). Nous émettons l'hypothèse que dans l'embryon précoce d'oursin, l'inhibition physiologique de la voie MAPK serait à l'origine du contrôle traductionnel d'eIF4E3. eIF4E3 serait alors responsable de la néosynthèse de messagers particuliers nécessaire au bon déroulement du cycle cellulaire (**Figure. 35**), comme c'est le cas dans le contexte pathologique des cellules cancéreuses (Landon et al., 2014).

3.5.3. Pallier l'inhibition de la traduction en mitose ?

Lors de la mitose, la traduction dépendante des IRES est favorisée (Liberman et al., 2009; Marash et al., 2008; Qin, 2004). Certaines protéines comme DAP5 et hnRNP-Q sont connues pour favoriser et réguler la traduction par les IRES, (Henis-Korenblit et al., 2000; Henis-Korenblit et al., 2002; Kim et al., 2007; Kim et al., 2010; Kim et al., 2012; Lee et al., 2012; Lewis et al., 2007; Liberman et al., 2009; Marash et al., 2008). Or, nous avons démontré que les protéines hnRNP-Q et DAP5 sont néosynthétisées à la fécondation (Article 4). L'embryon précoce d'oursin subit une succession de mitoses rapides (Parisi et al., 1978), nécessitant une augmentation de la synthèse protéique. Si l'initiation de la traduction indépendante de la coiffe augmente en mitose dans l'embryon d'oursin, elle pourrait nécessiter des protéines telles que DAP5 et hnRNP-Q, qui la favorisent. DAP5 et hnRNP-Q peuvent également remplacer respectivement eIF4G et PABP (Henis-Korenblit et al., 2000; Svitkin et al., 2013), deux facteurs d'initiation canoniques. Dans les cellules de mammifères, à l'instar d'eIF4E2 et d'eIF4E3, hnRNP-Q et DAP5 ont également la potentialité de former des complexes d'initiation alternatifs (Liberman et al., 2015; Svitkin et al., 2013). De la même

manière, ils pourraient également jouer un rôle dans une régulation sélective de la traduction, en faisant partie de complexes d'initiation alternatifs dans l'embryon d'oursin (**Figure. 35**). Il est particulièrement important que la capacité d'association de ces facteurs non-canoniques pour former un complexe d'initiation de la traduction alternatif soit démontrée. Une purification sur colonne de m⁷-GTP des échantillons, traités ou non à la [³⁵S]-Met permettrait de déterminer si ces protéines néosynthétisées forment des complexes.

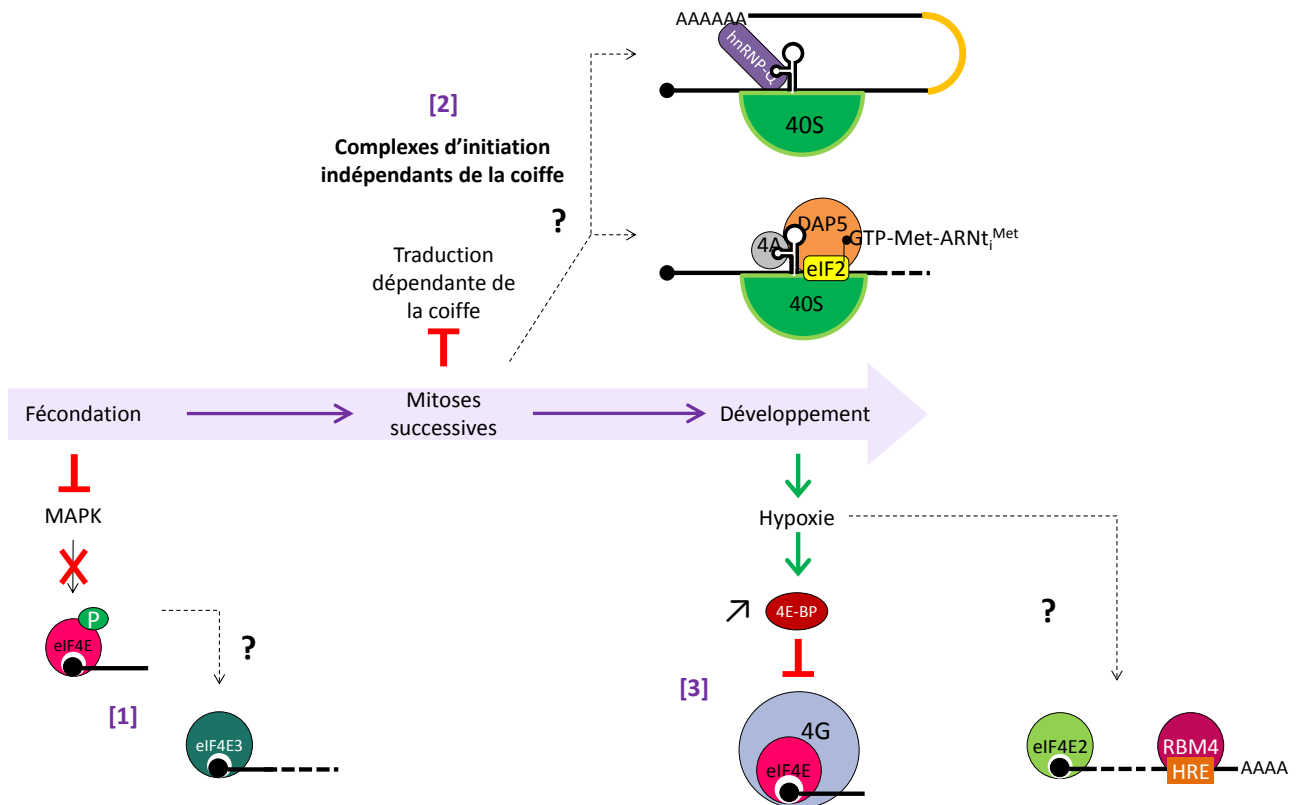


Figure 35 : Complexes alternatifs hypothétiques de l'initiation de la traduction dans l'embryon d'oursin. [1] A la fécondation, la voie MAPK est inactivée, ce qui, chez le mammifère inhibe la phosphorylation d'eIF4E, et diminue son efficacité de traduction (Landon et al., 2014). Il pourrait être remplacé par son homologue eIF4E3 néosynthétisé, comme c'est le cas dans les cellules de mammifères. [2] Dans les cellules de mammifères en mitose, l'inhibition de la traduction dépendante de la coiffe observée (Pyronnet et al., 2001) pourrait également exister dans l'embryon d'oursin. La néosynthèse de DAP5 et hnRNP-Q, qui sont des régulateurs de la traduction par les IRES (Kim et al., 2012; Liberman et al., 2009), renforce cette hypothèse. [3] Il y a une régionalisation de l'hypoxie au cours du développement embryonnaire de l'oursin (Coffman et al., 2004), or l'hypoxie augmente la quantité intracellulaire de l'inhibiteur 4E-BP (Le Bouffant et al., 2006), ce qui bloque l'initiation de la traduction classique. En réponse à l'hypoxie dans les cellules de mammifères, le complexe alternatif eIF4E2-RBM4-HIF2α se forme. Or, eIF4E2 et RBM4 sont néosynthétisés à la fécondation. L'embryon d'oursin se prépare peut-être au futur manque d'oxygène, pour maintenir la synthèse protéique dans ces cellules, d'autant qu'in vivo, eIF4E2 est très peu sensible à l'inhibition de l'initiation médiée par 4E-BP (Joshi et al., 2005).

Conclusion

Au cours de ce travail de thèse, nous avons obtenu des résultats importants pour la compréhension des régulations traductionnelles opérant à la fécondation de l'ovocyte d'oursin. Nous avons établi pour la première fois chez l'oursin les traductomes avant et après la fécondation, ce qui a permis de montrer que la traduction des ARNm maternels est extrêmement sélective. Le classement fonctionnel des transcrits préférentiellement traduits a révélé que ce sont majoritairement des protéines régulatrices qui sont traduites. Enfin, de manière originale, ce travail a permis la mise en évidence de la diversité et de la complexité des voies de signalisation en amont de la régulation traductionnelle, qui concourent à la sélectivité de la traduction.

L'approche holistique développée durant ce travail permet de passer d'une vision des régulations traductionnelles relativement simple (**Figure. 36**) à une vision beaucoup plus complexe et précise (**Figure. 37**).

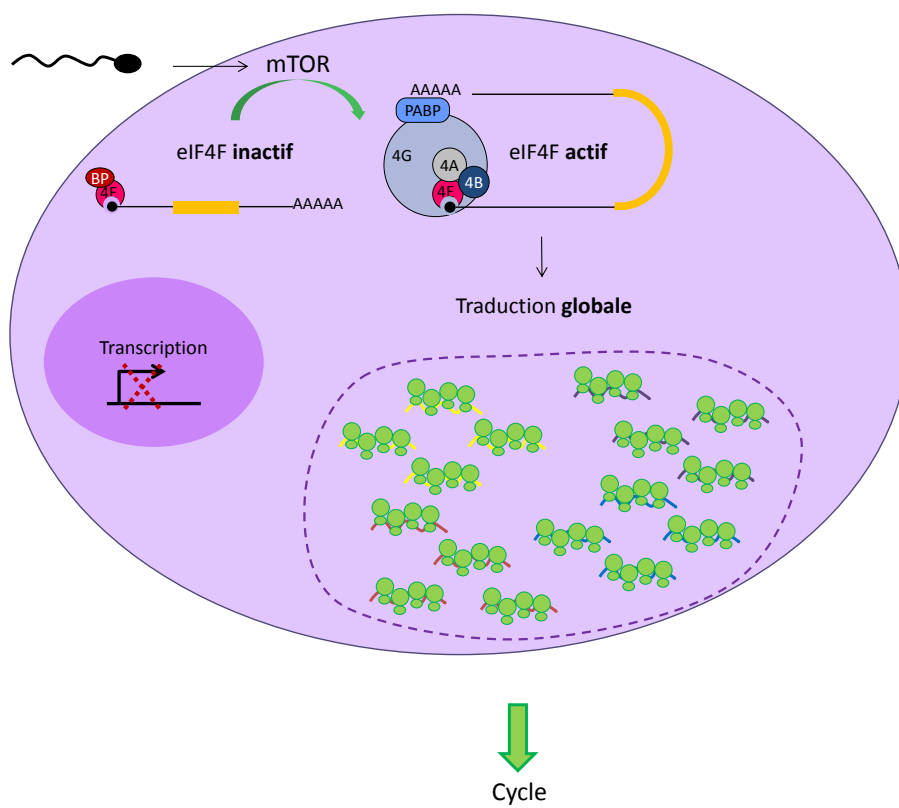


Figure 36 : Modèle de la reprise de la traduction à la fécondation de l'embryon d'oursin au début de la thèse.

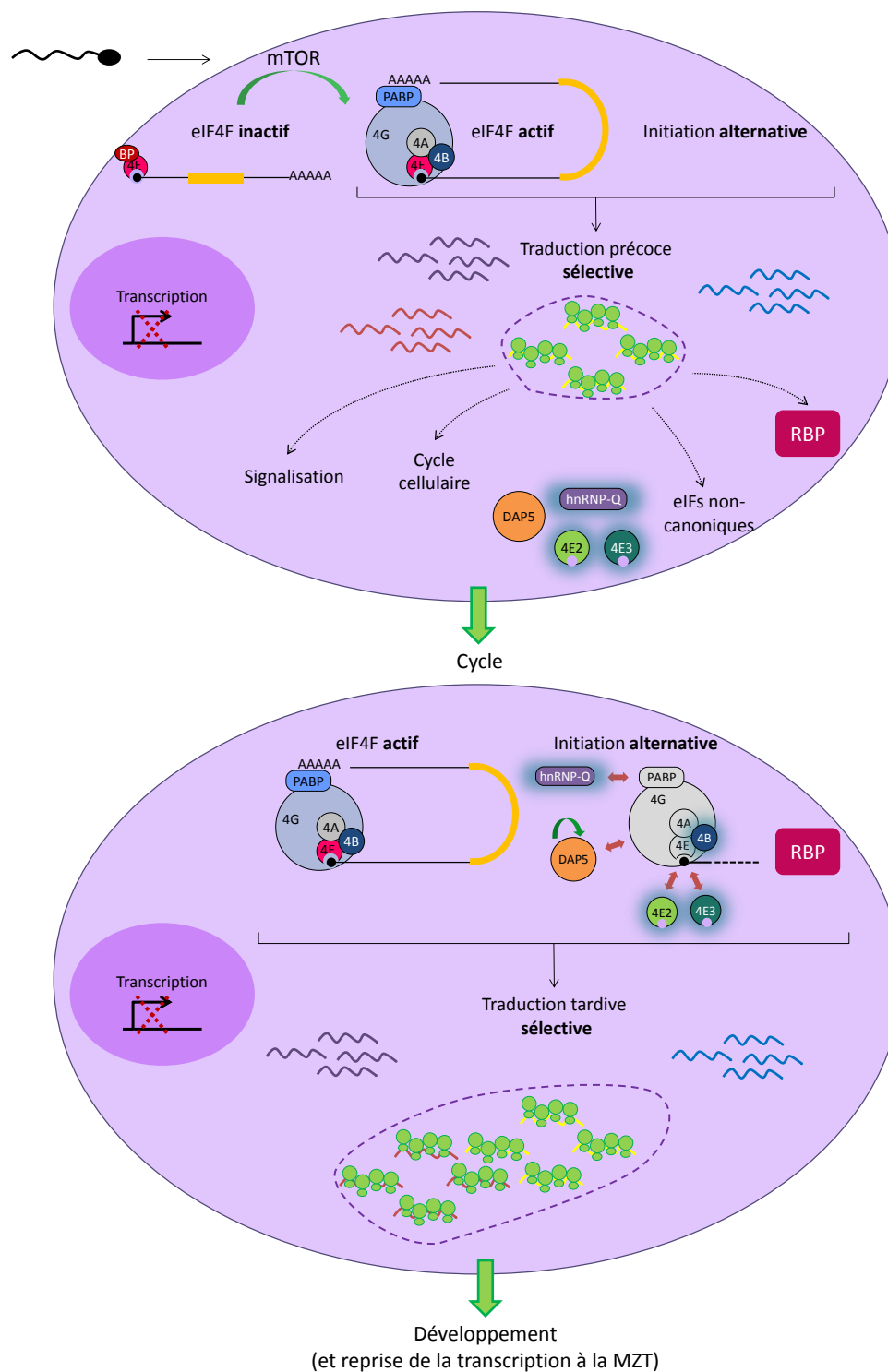


Figure 37 : Schématisation de l'apport du travail de thèse à la compréhension de la reprise de la traduction à la fécondation de l'embryon d'oursin.

Plus généralement, les informations qualitatives concernant les ARNm recrutés à la fécondation, et la compréhension de la complexité de la signalisation que cela implique sont à prendre impérativement en compte, pour l'appréhension de nouvelles questions biologiques. Cette thèse a permis la mise en place de solides fondations pour l'étude de la dynamique temporelle des régulations de la synthèse protéique, puisque la première étape, soit le passage de l'ovocyte à l'embryon, est à présent connue. Ainsi, nous avons démontré que les régulations traductionnelles ne peuvent plus être considérées comme mineures dans le réseau plus global qu'est la régulation de l'expression des gènes. Cela ouvre un champ d'investigation très vaste pour l'étude des régulations traductionnelles d'une part, et pour l'étude de la régulation du développement embryonnaire d'autre part. Nous avons démontré que les régulations traductionnelles précoces agissent sur des déterminants maternels indispensables à la mise en place des territoires embryonnaires. Or, dans le cadre de l'établissement du « *Gene Regulatory Network* » (GRN), la mise en place de ces territoires embryonnaires est étudiée au niveau des régulations transcriptionnelles, sans jamais considérer les régulations traductionnelles. Nous apportons à présent des arguments expérimentaux de l'existence d'un niveau de régulation supplémentaire dans la régulation de l'expression des gènes, en aval du GRN.

Bibliographie

- Alain, T., Morita, M., Fonseca, B. D., Yanagiya, A., Siddiqui, N., Bhat, M., Zammit, D., Marcus, V., Metrakos, P., Voyer, L.-A., et al.** (2012). eIF4E/4E-BP Ratio Predicts the Efficacy of mTOR Targeted Therapies. *Cancer Res.* **72**, 6468–6476.
- Albert, L., Karsy, M., Murali, R. and Jhanwar-Uniyal, M.** (2009). Inhibition of mTOR activates the MAPK pathway in glioblastoma multiforme. *Cancer Genomics and Proteomics* **6**, 255–261.
- Alexandraki, D. and Ruderman, J. V** (1985a). Multiple polymorphic alpha- and beta-tubulin mRNAs are present in sea urchin eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 134–138.
- Alexandraki, D. and Ruderman, J. V.** (1985b). Expression of α - and β -tubulin genes during development of sea urchin embryos. *Dev. Biol.* **109**, 436–451.
- Alves, V. S., Motta, F. L., Roff  , M., Delamano, A., Pesquero, J. B. and Castilho, B. A.** (2009). GCN2 activation and eIF2 α phosphorylation in the maturation of mouse oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378**, 41–44.
- Apfel, B., Blair, J. A., Gonzalez, B., Nazif, T. M., Feldman, M. E., Aizenstein, B., Hoffman, R., Williams, R. L., Shokat, K. M. and Knight, Z. A.** (2008). Targeted polypharmacology: discovery of dual inhibitors of tyrosine and phosphoinositide kinases. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 691–699.
- Aze, A., Fayet, C., Lapasset, L. and Genevi  re, A. M.** (2010). Replication origins are already licensed in G1 arrested unfertilized sea urchin eggs. *Dev. Biol.* **340**, 557–570.
- Azzam, M. E. and Algranati, I. D.** (1973). Mechanism of puromycin action: fate of ribosomes after release of nascent protein chains from polysomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 3866–3869.
- Bah, A., Vernon, R. M., Siddiqui, Z., Krzeminski, M., Muhandiram, R., Zhao, C., Sonenberg, N., Kay, L. E. and Forman-Kay, J. D.** (2014). Folding of an intrinsically disordered protein by phosphorylation as a regulatory switch. *Nature* **519**, 106–109.
- Baker, C. C. and Fuller, M. T.** (2007). Translational control of meiotic cell cycle progression and spermatid differentiation in male germ cells by a novel eIF4G homolog. *Development* **134**, 2863–2869.
- Barhoom, S., Kaur, J., Cooperman, B. S., Smorodinsky, N. I., Smilansky, Z., Ehrlich, M. and Elroy-Stein, O.** (2011). Quantitative single cell monitoring of protein synthesis at subcellular resolution using fluorescently labeled tRNA. *Nucleic Acids Res.* **39**, e129–e129.
- Bédard, P. A. and Brandhorst, B. P.** (1983). Patterns of protein synthesis and metabolism during sea urchin embryogenesis. *Dev. Biol.* **96**, 74–83.
- Bédard, P. A. and Brandhorst, B. P.** (1986). Translational activation of maternal mRNA encoding the heat-shock protein hsp90 during sea urchin embryogenesis. *Dev. Biol.* **117**, 286–293.
- Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C. and Hall, M. N.** (2011). Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 868–880.

- Biyanee, A., Ohnheiser, J., Singh, P. and Klempnauer, K.-H.** (2014). A novel mechanism for the control of translation of specific mRNAs by tumor suppressor protein Pdc4: inhibition of translation elongation. *Oncogene* **34**, 1–9.
- Blower, M. D., Feric, E., Weis, K. and Heald, R.** (2007). Genome-wide analysis demonstrates conserved localization of messenger RNAs to mitotic microtubules. *J. Cell Biol.* **179**, 1365–1373.
- Brandhorst, B. P.** (1976). Two-dimensional gel patterns of protein synthesis before and after fertilization of sea urchin eggs. *Dev. Biol.* **52**, 310–317.
- Brown, E. J., Albers, M. W., Shin, T. B., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S. and Schreiber, S. L.** (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* **369**, 756–758.
- Burotto, M., Chiou, V. L., Lee, J.-M. and Kohn, E. C.** (2014). The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. *Cancer* **120**, 3446–3456.
- Buttgereit, F. and Brand, M. D.** (1995). A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem. J.* **312**, 163–167.
- Caron, S., Charon, M., Cramer, E., Sonenberg, N. and Dusanter-Fourt, I.** (2004). Selective modification of eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F) at the onset of cell differentiation: recruitment of eIF4GII and long-lasting phosphorylation of eIF4E. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4920–4928.
- Carracedo, A., Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Rojo, F., Salmena, L., Alimonti, A., Egia, A., Sasaki, A. T., Thomas, G., Kozma, S. C., et al.** (2008). Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J. Clin. Invest.* **118**, 3065–3074.
- Carrington, J. C. and Freed, D. D.** (1990). Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *J. Virol.* **64**, 1590–1597.
- Charlesworth, A., Wilczynska, A., Thampi, P., Cox, L. L. and MacNicol, A. M.** (2006). Musashi regulates the temporal order of mRNA translation during *Xenopus* oocyte maturation. *EMBO J.* **25**, 2792–2801.
- Charlesworth, A., Meijer, H. A. and De Moor, C. H.** (2013). Specificity factors in cytoplasmic polyadenylation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **4**, 437–461.
- Chen, J., Melton, C., Suh, N., Oh, J. S., Horner, K., Xie, F., Sette, C., Blelloch, R. and Conti, M.** (2011). Genome-wide analysis of translation reveals a critical role for deleted in azoospermia-like (Dazl) at the oocyte-to-zygote transition. *Genes Dev.* **25**, 755–766.
- Chen, J., Torcia, S., Xie, F., Lin, C.-J., Cakmak, H., Franciosi, F., Horner, K., Onodera, C., Song, J. S., Cedars, M. I., et al.** (2013). Somatic cells regulate maternal mRNA translation and developmental competence of mouse oocytes. *Nat. Cell Biol.* **15**, 1415–1423.
- Cho, P. F., Poulin, F., Cho-Park, Y. A., Cho-Park, I. B., Chicoine, J. D., Lasko, P. and Sonenberg, N.** (2005). A New Paradigm for Translational Control: Inhibition via 5'-3' mRNA Tethering by Bicoid and the eIF4E Cognate 4EHP. *Cell* **121**, 411–423.

- Choi, J., Chen, J., Schreiber, S. L. and Clardy, J.** (1996). Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* **273**, 239–242.
- Choo, A. Y., Yoon, S.-O., Kim, S. G., Roux, P. P. and Blenis, J.** (2008). Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 17414–17419.
- Chresta, C. M., Davies, B. R., Hickson, I., Harding, T., Cosulich, S., Critchlow, S. E., Vincent, J. P., Ellston, R., Jones, D., Sini, P., et al.** (2010). AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res.* **70**, 288–298.
- Coffman, J. A., McCarthy, J. J., Dickey-Sims, C. and Robertson, A. J.** (2004). Oral-aboral axis specification in the sea urchin embryo: II. Mitochondrial distribution and redox state contribute to establishing polarity in *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev. Biol.* **273**, 160–171.
- Coldwell, M. J., Cowan, J. L., Vlasak, M., Mead, A., Willett, M., Perry, L. S. and Morley, S. J.** (2013). Phosphorylation of eIF4GII and 4E-BP1 in response to nocodazole treatment: A reappraisal of translation initiation during mitosis. *Cell Cycle* **12**, 3615–3628.
- Coller, J. and Parker, R.** (2005). General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* **122**, 875–886.
- Collier, B., Gorgoni, B., Loveridge, C., Cooke, H. J. and Gray, N. K.** (2005). The DAZL family proteins are PABP-binding proteins that regulate translation in germ cells. *EMBO J.* **24**, 2656–2666.
- Cormier, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Sonenberg, N. and Bellé, R.** (2001). eIF4E Association with 4E-BP Decreases Rapidly Following Fertilization in Sea Urchin. *Dev. Biol.* **232**, 275–283.
- Costache, V., Bilotto, S., Laguerre, L., Bellé, R., Cosson, B., Cormier, P. and Morales, J.** (2012). Dephosphorylation of eIF2 α is essential for protein synthesis increase and cell cycle progression after sea urchin fertilization. *Dev. Biol.* **365**, 303–309.
- Dai, N., Rapley, J., Ange, M., Yanik, F. M., Blower, M. D. and Avruch, J.** (2011). mTOR phosphorylates IMP2 to promote IGF2 mRNA translation by internal ribosomal entry. *Genes Dev.* **25**, 1159–1172.
- Davidson, E. H.** (1986). Utilization of maternal mRNA in development. In *Gene Activity in Early Development*, pp. 69–91. Elsevier.
- De Benedetti, A. and Harris, A. L.** (1999). eIF4E expression in tumors: Its possible role in progression of malignancies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 59–72.
- Derry, M. C., Yanagiya, A., Martineau, Y. and Sonenberg, N.** (2006). Regulation of poly(A)-binding protein through PABP-interacting proteins. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, pp. 537–543.
- Deschênes-Simard, X., Gaumont-Leclerc, M.-F., Bourdeau, V., Lessard, F., Moiseeva, O., Forest, V., Igelmann, S., Mallette, F. A., Saba-El-Leil, M. K., Meloche, S., et al.** (2013). Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes Dev.* **27**, 900–915.

- Dobrikov, M., Dobrikova, E., Shveygert, M. and Gromeier, M.** (2011). Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4G1 (eIF4G1) by protein kinase C{alpha} regulates eIF4G1 binding to Mnk1. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 2947–2959.
- Draper, B. W., Mello, C. C., Bowerman, B., Hardin, J. and Priess, J. R.** (1996). MEX-3 Is a KH Domain Protein That Regulates Blastomere Identity in Early *C. elegans* Embryos. *Cell* **87**, 205–216.
- Epel, D.** (1967). Protein synthesis in sea urchin eggs: a “late” response to fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **57**, 899–906.
- Epel, D.** (1972). Activation of an Na⁺-dependent amino acid transport system upon fertilization of sea urchin eggs. *Exp. Cell Res.* **72**, 74–89.
- Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D. and Hunt, T.** (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**, 389–396.
- Fabian, M. R., Mathonnet, G., Sundermeier, T., Mathys, H., Zipprich, J. T., Svitkin, Y. V., Rivas, F., Jinek, M., Wohlschlegel, J., Doudna, J. A., et al.** (2009). Mammalian miRNA RISC Recruits CAF1 and PABP to Affect PABP-Dependent Deadenylation. *Mol. Cell* **35**, 868–880.
- Fehler, O., Singh, P., Haas, A., Ulrich, D., Muller, J. P., Ohnheiser, J. and Klempnauer, K.-H.** (2014). An evolutionarily conserved interaction of tumor suppressor protein Pdc4 with the poly(A)-binding protein contributes to translation suppression by Pdc4. *Nucleic Acids Res.* **42**, 11107–11118.
- Feldman, M. E., Apsel, B., Uotila, A., Loewith, R., Knight, Z. A., Ruggero, D. and Shokat, K. M.** (2009). Active-Site Inhibitors of mTOR Target Rapamycin-Resistant Outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol.* **7**, e1000038.
- Fonseca, B. D., Smith, E. M., Yelle, N., Alain, T., Bushell, M. and Pause, A.** (2014). The ever-evolving role of mTOR in translation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 1–12.
- Fonseca, B. D., Zakaria, C., Jia, J.-J., Graber, T. E., Svitkin, Y., Tahmasebi, S., Healy, D., Hoang, H.-D., Jensen, J. M., Diao, I. T., et al.** (2015). La-related Protein 1 (LARP1) Represses Terminal Oligopyrimidine (TOP) mRNA Translation Downstream of mTOR Complex 1 (mTORC1). *J. Biol. Chem.* **290**, 15996–16020.
- Fromson, D. and Duchastel, A.** (1975). Poly(A)-containing polyribosomal RNA in sea urchin embryos: Changes in proportion during development. *Biochim. Biophys. Acta - Nucleic Acids Protein Synth.* **378**, 394–404.
- Fry, A. M., O'Regan, L., Sabir, S. R. and Bayliss, R.** (2012). Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases. *J. Cell Sci.* **125**, 4423–4433.
- Fukao, A., Mishima, Y., Takizawa, N., Oka, S., Imataka, H., Pelletier, J., Sonenberg, N., Thoma, C. and Fujiwara, T.** (2014). MicroRNAs Trigger Dissociation of eIF4AI and eIF4AII from Target mRNAs in Humans. *Mol. Cell* **56**, 79–89.

- Furic, L., Rong, L., Larsson, O., Koumakpayi, I. H., Yoshida, K., Brueschke, A., Petroulakis, E., Robichaud, N., Pollak, M., Gaboury, L. A., et al.** (2010). eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 14134–14139.
- Gingras, A. C., Kennedy, S. G., O’Leary, M. A., Sonenberg, N. and Hay, N.** (1998). 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev.* **12**, 502–513.
- Gingras, A., Raught, B. and Sonenberg, N.** (1999). eIF4 Initiation Factors: Effectors of mRNA Recruitment to Ribosomes and Regulators of Translation. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 913–963.
- Gosselin, P., Oulhen, N., Jam, M., Ronzca, J., Cormier, P., Czjzek, M. and Cosson, B.** (2011). The translational repressor 4E-BP called to order by eIF4E: new structural insights by SAXS. *Nucleic Acids Res.* **39**, 3496–3503.
- Graber, T. E., Hebert-Seropian, S., Khoutorsky, A., David, A., Yewdell, J. W., Lacaille, J.-C. and Sossin, W. S.** (2013). Reactivation of stalled polyribosomes in synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 16205–16210.
- Gradi, A., Imataka, H., Svitkin, Y. V., Rom, E., Raught, B., Morino, S. and Sonenberg, N.** (1998). A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 334–342.
- Graindorge, A., Le Tonquèze, O., Thuret, R., Pollet, N., Osborne, H. B. and Audic, Y.** (2008). Identification of CUG-BP1/EDEN-BP target mRNAs in *Xenopus tropicalis*. *Nucleic Acids Res.* **36**, 1861–1870.
- Gustafson, E. A., Yajima, M., Juliano, C. E. and Wessel, G. M.** (2011). Post-translational regulation by gustavus contributes to selective Vasa protein accumulation in multipotent cells during embryogenesis. *Dev Biol* **349**, 440–450.
- Hannan, K. M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G. A., Pearson, R. B., et al.** (2003). mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 8862–8877.
- Heitman, J., Movva, N. R. and Hall, M. N.** (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**, 905–909.
- Henis-Korenblit, S., Strumpf, N. L., Goldstaub, D. and Kimchi, A.** (2000). A novel form of DAP5 protein accumulates in apoptotic cells as a result of caspase cleavage and internal ribosome entry site-mediated translation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 496–506.
- Henis-Korenblit, S., Shani, G., Sines, T., Marash, L., Shohat, G. and Kimchi, A.** (2002). The caspase-cleaved DAP5 protein supports internal ribosome entry site-mediated translation of death proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 5400–5405.
- Hinnebusch, A. G.** (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 407–450.

- Hoang, B., Benavides, A., Shi, Y., Yang, Y., Frost, P., Gera, J. and Lichtenstein, A.** (2012). The PP242 Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibitor Activates Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) in Multiple Myeloma Cells via a Target of Rapamycin Complex 1 (TORC1)/ Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (eIF-4E)/RAF Pathway and Acti. *J. Biol. Chem.* **287**, 21796–21805.
- Holcik, M. and Sonenberg, N.** (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 318–327.
- Horner, V. L. and Wolfner, M. F.** (2008). Transitioning from egg to embryo: Triggers and mechanisms of egg activation. *Dev. Dyn.* **237**, 527–544.
- Hsieh, A. C. and Ruggero, D.** (2010). Targeting eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in cancer. *Clin. Cancer Res.* **16**, 4914–4920.
- Hsieh, A. C., Liu, Y., Edlind, M. P., Ingolia, N. T., Janes, M. R., Sher, A., Shi, E. Y., Stumpf, C. R., Christensen, C., Bonham, M. J., et al.** (2012). The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature* **485**, 55–61.
- Humphreys, T.** (1971). Measurements of messenger RNA entering polysomes upon fertilization of sea urchin eggs. *Dev. Biol.* **26**, 201–208.
- Iacono, M., Mignone, F. and Pesole, G.** (2005). uAUG and uORFs in human and rodent 5' untranslated mRNAs. *Gene* **349**, 97–105.
- Iadevaia, V., Caldarola, S., Tino, E., Amaldi, F. and Loreni, F.** (2008). All translation elongation factors and the e, f, and h subunits of translation initiation factor 3 are encoded by 5'-terminal oligopyrimidine (TOP) mRNAs. *Rna* **14**, 1730–1736.
- Inada, T., Winstall, E., Tarun, S. Z., Yates, J. R., Schieltz, D. and Sachs, A. B.** (2002). One-step affinity purification of the yeast ribosome and its associated proteins and mRNAs. *RNA* **8**, 948–958.
- Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R. S. and Weissman, J. S.** (2009). Genome-Wide Analysis in Vivo of Translation with Nucleotide Resolution Using Ribosome Profiling. *Science* (5924). **324**, 218–223.
- Izaurralde, E.** (2015). Breakers and blockers--miRNAs at work. *Science* (6246). **349**, 380–382.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T. and Pestova, T. V.** (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 113–127.
- Jaffe, L. A. and Cross, N. L.** (1986). Electrical Regulation of Sperm-EGG Fusion. *Annu. Rev. Physiol.* **48**, 191–200.
- Jahangiri, A. and Weiss, W. A.** (2013). It Takes Two to Tango: Dual Inhibition of PI3K and MAPK in Rhabdomyosarcoma. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5811–5813.
- Jiang, H., Coleman, J., Miskimins, R. and Miskimins, W. K.** (2003). No Title. *Cancer Cell Int.* **3**, 2.
- Joshi, B., Cameron, A. and Jagus, R.** (2004). Characterization of mammalian eIF4E-family members. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2189–2203.

- Joshi, B., Lee, K., Maeder, D. L. and Jagus, R.** (2005). No Title. *BMC Evol. Biol.* **5**, 48.
- Jung, M.-Y., Lorenz, L. and Richter, J. D.** (2006). Translational control by neuroguidin, a eukaryotic initiation factor 4E and CPEB binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 4277–4287.
- Kahvejian, A., Roy, G. and Sonenberg, N.** (2001). The mRNA closed-loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **66**, 293–300.
- Karim, M. M., Svitkin, Y. V., Kahvejian, A., De Crescenzo, G., Costa-Mattioli, M. and Sonenberg, N.** (2006). A mechanism of translational repression by competition of Paip2 with eIF4G for poly(A) binding protein (PABP) binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 9494–9499.
- Kelso-Winemiller, L. C. and Winkler, M. M.** (1991). “Unmasking” of stored maternal mRNAs and the activation of protein synthesis at fertilization in sea urchins. *Development* **111**, 623–633.
- Kelso-Winemiller, L., Yoon, J., Peeler, M. T. and Winkler, M. M.** (1993). Sea urchin maternal mRNA classes with distinct development regulation. *Dev. Genet.* **14**, 397–406.
- Kenny, A. P., Kozlowski, D., Oleksyn, D. W., Angerer, L. M. and Angerer, R. C.** (1999). SpSoxB1, a maternally encoded transcription factor asymmetrically distributed among early sea urchin blastomeres. *Development* **126**, 5473–5483.
- Kenny, A. P., Oleksyn, D. W., Newman, L. A., Angerer, R. C. and Angerer, L. M.** (2003). Tight regulation of SpSoxB factors is required for patterning and morphogenesis in sea urchin embryos. *Dev. Biol.* **261**, 412–425.
- Khaleghpour, K., Kahvejian, A., De Crescenzo, G., Roy, G., Svitkin, Y. V., Imataka, H., O'Connor-McCourt, M. and Sonenberg, N.** (2001). Dual Interactions of the Translational Repressor Paip2 with Poly(A) Binding Protein. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 5200–5213.
- Kilberg, M. S., Shan, J. and Su, N.** (2009). ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol. Metab.* **20**, 436–443.
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D. M.** (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110**, 163–175.
- Kim, T. D., Woo, K. C., Cho, S., Ha, D. C., Sung, K. J. and Kim, K. T.** (2007). Rhythmic control of AANAT translation by hnRNP Q in circadian melatonin production. *Genes Dev.* **21**, 797–810.
- Kim, D. Y., Woo, K. C., Lee, K. H., Kim, T. D. and Kim, K. T.** (2010). hnRNP Q and PTB modulate the circadian oscillation of mouse Rev-erb alpha via IRES-mediated translation. *Nucleic Acids Res.* **38**, 7068–7078.
- Kim, D.-Y., Kim, W., Lee, K.-H., Kim, S.-H., Lee, H.-R., Kim, H.-J., Jung, Y., Choi, J.-H. and Kim, K.-T.** (2012). hnRNP Q regulates translation of p53 in normal and stress conditions. *Cell Death Differ.* **20**, 226–234.
- King, H. A. and Gerber, A. P.** (2014). Translatome profiling: methods for genome-scale analysis of mRNA translation. *Brief. Funct. Genomics* 1–10.

- Komar, A. A. and Hatzoglou, M.** (2011). Cellular IRES-mediated translation. *Cell Cycle* **10**, 229–240.
- Koromilas, A. E., Lazaris-Karatzas, A. and Sonenberg, N.** (1992). mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *EMBO J.* **11**, 4153–4158.
- Kronja, I., Whitfield, Z. J., Yuan, B., Dzek, K., Kirkpatrick, J., Krijgsveld, J. and Orr-Weaver, T. L.** (2014a). Quantitative proteomics reveals the dynamics of protein changes during *Drosophila* oocyte maturation and the oocyte-to-embryo transition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 16023–16028.
- Kronja, I., Yuan, B., Eichhorn, S. W., Dzek, K., Krijgsveld, J., Bartel, D. P. and Orr-Weaver, T. L.** (2014b). Widespread Changes in the Posttranscriptional Landscape at the *Drosophila* Oocyte-to-Embryo Transition. *Cell Rep.* **7**, 1495–1508.
- Kuersten, S., Radek, A., Vogel, C. and Penalva, L. O. F.** (2013). Translation regulation gets its “omics” moment. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **4**, 617–630.
- Kuge, H. and Inoue, A.** (1992). Maturation of *Xenopus laevis* oocyte by progesterone requires poly(A) tail elongation of mRNA. *Exp. Cell Res.* **202**, 52–58.
- Landon, A. L., Muniandy, P. A., Shetty, A. C., Lehrmann, E., Volpon, L., Houg, S., Zhang, Y., Dai, B., Peroutka, R., Mazan-Mamczarz, K., et al.** (2014). MNKs act as a regulatory switch for eIF4E1 and eIF4E3 driven mRNA translation in DLBCL. *Nat. Commun.* **5**, 5413.
- Lapraz, F., Röttinger, E., Duboc, V., Range, R., Duloquin, L., Walton, K., Wu, S.-Y., Bradham, C., Loza, M. A., Hibino, T., et al.** (2006). RTK and TGF- β signaling pathways genes in the sea urchin genome. *Dev. Biol.* **300**, 132–152.
- Lazaris-Karatzas, A., Montine, K. S. and Sonenberg, N.** (1990). Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature* **345**, 544–547.
- Le Bouffant, R., Cormier, P., Mulner-Lorillon, O. and Bellé, R.** (2006). Hypoxia and DNA-damaging agent bleomycin both increase the cellular level of the protein 4E-BP. *J. Cell. Biochem.* **99**, 126–132.
- Le Breton, M., Bellé, R., Cormier, P., Mulner-Lorillon, O. and Morales, J.** (2003). M-phase regulation of the recruitment of mRNAs onto polysomes using the CDK1/cyclin B inhibitor aminopurvalanol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 880–886.
- Le Breton, M., Cormier, P., Bellé, R., Mulner-Lorillon, O. and Morales, J.** (2005). Translational control during mitosis. *Biochimie* **87**, 805–811.
- Lee, K.-H., Woo, K.-C., Kim, D.-Y., Kim, T.-D., Shin, J., Park, S. M., Jang, S. K. and Kim, K.-T.** (2012). Rhythmic Interaction between Period1 mRNA and hnRNP Q Leads to Circadian Time-Dependent Translation. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 717–728.
- Lewis, S. M., Cerquozzi, S., Graber, T. E., Ungureanu, N. H., Andrews, M. and Holcik, M.** (2007). The eIF4G homolog DAP5/p97 supports the translation of select mRNAs during endoplasmic reticulum stress. *Nucleic Acids Res.* **36**, 168–178.

- Liberman, N., Marash, L. and Kimchi, A.** (2009). The translation initiation factor DAP5 is a regulator of cell survival during mitosis. *Cell Cycle* **8**, 204–209.
- Liberman, N., Gandin, V., Svitkin, Y. V., David, M., Virgili, G., Jaramillo, M., Holcik, M., Nagar, B., Kimchi, A. and Sonenberg, N.** (2015). DAP5 associates with eIF2 and eIF4AI to promote Internal Ribosome Entry Site driven translation. *Nucleic Acids Res.* **43**, 3764–3775.
- Ling, J., Morley, S. J. and Traugh, J. A.** (2005). Inhibition of cap-dependent translation via phosphorylation of eIF4G by protein kinase Pak2. *EMBO J.* **24**, 4094–4105.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P. and Hall, M. N.** (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell* **10**, 457–468.
- Ma, X. M. and Blenis, J.** (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 307–318.
- Mader, S., Lee, H., Pause, A. and Sonenberg, N.** (1995). The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4990–4997.
- Malina, A., Mills, J. R. and Pelletier, J.** (2012). Emerging Therapeutics Targeting mRNA Translation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a012377–a012377.
- Malkin, L. I., Gross, P. R. and Romanoff, P.** (1964). Polyribosomal protein synthesis in fertilized sea urchin eggs: the effect of Actinomycin treatment. *Dev. Biol.* **10**, 378–394.
- Mamane, Y., Petroulakis, E., Martineau, Y., Sato, T.-A., Larsson, O., Rajasekhar, V. K. and Sonenberg, N.** (2007). Epigenetic Activation of a Subset of mRNAs by eIF4E Explains Its Effects on Cell Proliferation. *PLoS One* **2**, e242.
- Marash, L., Liberman, N., Henis-Korenblit, S., Sivan, G., Reem, E., Elroy-Stein, O. and Kimchi, A.** (2008). DAP5 Promotes Cap-Independent Translation of Bcl-2 and CDK1 to Facilitate Cell Survival during Mitosis. *Mol. Cell* **30**, 447–459.
- Martin, K. A. and Miller, O. L.** (1983). Polysome structure in sea urchin eggs and embryos: an electron microscopic analysis. *Dev. Biol.* **98**, 338–348.
- Martineau, Y., Derry, M. C., Wang, X., Yanagiya, A., Berlanga, J. J., Shyu, A.-B., Imataka, H., Gehring, K. and Sonenberg, N.** (2008). Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 6658–6667.
- Meijer, L., Arion, D., Pines, J., Brizuela, L. and Beach, D.** (1989). Cyclin is a component of the specific histone H1 kinase. *EMBO J.* **8**, 2275 – 2282.
- Meijer, H. A., Kong, Y. W., Lu, W. T., Wilczynska, A., Spriggs, R. V., Robinson, S. W., Godfrey, J. D., Willis, A. E. and Bushell, M.** (2013). Translational Repression and eIF4A2 Activity Are Critical for MicroRNA-Mediated Gene Regulation. *Science (6128)*. **340**, 82–85.
- Mendoza, M. C., Er, E. E. and Blenis, J.** (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 320–328.

- Miloslavski, R., Cohen, E., Avraham, A., Iluz, Y., Hayouka, Z., Kasir, J., Mudhasani, R., Jones, S. N., Cybulski, N., Rüegg, M. A., et al.** (2014). Oxygen sufficiency controls TOP mRNA translation via the TSC-Rheb-mTOR pathway in a 4E-BP-independent manner. *J. Mol. Cell Biol.* **6**, 255–266.
- Modelska, A., Turro, E., Russell, R., Beaton, J., Sbarrato, T., Spriggs, K., Miller, J., Gräf, S., Provenzano, E., Blows, F., et al.** (2015). The malignant phenotype in breast cancer is driven by eIF4A1-mediated changes in the translational landscape. *Cell Death Dis.* **6**, e1603.
- Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Cosson, B., Morin, E., Bellé, R., Bradham, C. A., Beane, W. S. and Cormier, P.** (2006). Translational control genes in the sea urchin genome. *Dev. Biol.* **300**, 293–307.
- Morita, M., Ler, L. W., Fabian, M. R., Siddiqui, N., Mullin, M., Henderson, V. C., Alain, T., Fonseca, B. D., Karashchuk, G., Bennett, C. F., et al.** (2012). A Novel 4EHP-GIGYF2 Translational Repressor Complex Is Essential for Mammalian Development. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 3585–3593.
- Oh, W. J., Wu, C., Kim, S. J., Facchinetti, V., Julien, L.-A., Finlan, M., Roux, P. P., Su, B. and Jacinto, E.** (2010). mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. *EMBO J.* **29**, 3939–3951.
- Ohlmann, T., Prévôt, D., Décimo, D., Roux, F., Garin, J., Morley, S. J. and Darlix, J. L.** (2002). In vitro cleavage of eIF4GI but not eIF4GII by HIV-1 protease and its effects on translation in the rabbit reticulocyte lysate system. *J. Mol. Biol.* **318**, 9–20.
- Osborne, M. J., Volpon, L., Kornblatt, J. A., Culjkovic-Kraljacic, B., Baguet, A. and Borden, K. L. B.** (2013). eIF4E3 acts as a tumor suppressor by utilizing an atypical mode of methyl-7-guanosine cap recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 3877–3882.
- Oulhen, N., Salaün, P., Cosson, B., Cormier, P. and Morales, J.** (2007). After fertilization of sea urchin eggs, eIF4G is post-translationally modified and associated with the cap-binding protein eIF4E. *J. Cell Sci.* **120**, 425–434.
- Oulhen, N., Boulben, S., Bidinosti, M., Morales, J., Cormier, P. and Cosson, B.** (2009). A variant mimicking hyperphosphorylated 4E-BP inhibits protein synthesis in a sea urchin cell-free, cap-dependent translation system. *PLoS One* **4**, e5070.
- Parisi, E., Filosa, S., De Petrocellis, B. and Monroy, A.** (1978). The pattern of cell division in the early development of the sea urchin. *Paracentrotus lividus*. *Dev. Biol.* **65**, 38–49.
- Park, S. M., Paek, K. Y., Hong, K. Y., Jang, C. J., Cho, S., Park, J. H., Kim, J. H., Jan, E. and Jang, S. K.** (2011). Translation-competent 48S complex formation on HCV IRES requires the RNA-binding protein NSAP1. *Nucleic Acids Res.* **39**, 7791–7802.
- Passmore, L. A., Schmeing, T. M., Maag, D., Applefield, D. J., Acker, M. G., Algire, M. A., Lorsch, J. R. and Ramakrishnan, V.** (2007). The Eukaryotic Translation Initiation Factors eIF1 and eIF1A Induce an Open Conformation of the 40S Ribosome. *Mol. Cell* **26**, 41–50.
- Pelech, S. L., Tombes, R. M., Meijer, L. and Krebs, E. G.** (1988). Activation of myelin basic protein kinases during echinoderm oocyte maturation and egg fertilization. *Dev. Biol.* **130**, 28–36.

- Pelletier, J. and Sonenberg, N.** (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**, 320–325.
- Peter, D., Igreja, C., Weber, R., Wohlbold, L., Weiler, C., Ebertsch, L., Weichenrieder, O. and Izaurralde, E.** (2015). Molecular Architecture of 4E-BP Translational Inhibitors Bound to eIF4E. *Mol. Cell* 1074–1087.
- Piqué, M., López, J. M., Foissac, S., Guigó, R. and Méndez, R.** (2008). A Combinatorial Code for CPE-Mediated Translational Control. *Cell* **132**, 434–448.
- Potireddy, S., Vassena, R., Patel, B. G. and Latham, K. E.** (2006). Analysis of polysomal mRNA populations of mouse oocytes and zygotes: Dynamic changes in maternal mRNA utilization and function. *Dev. Biol.* **298**, 155–166.
- Potireddy, S., Midic, U., Liang, C.-G., Obradovic, Z. and Latham, K. E.** (2010). Positive and negative cis-regulatory elements directing postfertilization maternal mRNA translational control in mouse embryos. *AJP Cell Physiol.* **299**, C818–C827.
- Poulin, F., Gingras, A. C., Olsen, H., Chevalier, S. and Sonenberg, N.** (1998). 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *J. Biol. Chem.* **273**, 14002–14007.
- Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A. C., Fukunaga, R., Hunter, T. and Sonenberg, N.** (1999). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits Mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J.* **18**, 270–279.
- Pyronnet, S., Dostie, J. and Sonenberg, N.** (2001). Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes Dev.* **15**, 2083–2093.
- Qin, X.** (2004). Preferential Translation of Internal Ribosome Entry Site-containing mRNAs during the Mitotic Cycle in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 13721–13728.
- Qin, H., Raught, B., Sonenberg, N., Goldstein, E. G. and Edelman, A. M.** (2003). Phosphorylation screening identifies translational initiation factor 4GII as an intracellular target of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I. *J. Biol. Chem.* **278**, 48570–48579.
- Qin, X., Ahn, S., Speed, T. P. and Rubin, G. M.** (2007). Global analyses of mRNA translational control during early *Drosophila* embryogenesis. *Genome Biol.* **8**, R63.
- Quaresma, A. J. C., Bressan, G. C., Gava, L. M., Lanza, D. C. F., Ramos, C. H. I. and Kobarg, J.** (2009). Human hnRNP Q re-localizes to cytoplasmic granules upon PMA, thapsigargin, arsenite and heat-shock treatments. *Exp. Cell Res.* **315**, 968–980.
- Radford, H. E., Meijer, H. A. and de Moor, C. H.** (2008). Translational control by cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1779**, 217–229.
- Raught, B., Gingras, A. C., Gygi, S. P., Imataka, H., Morino, S., Gradi, A., Aebersold, R. and Sonenberg, N.** (2000). Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4GI. *EMBO J.* **19**, 434–444.

- Renshaw, J., Taylor, K. R., Bishop, R., Valenti, M., De Haven Brandon, A., Gowan, S., Eccles, S. A., Ruddle, R. R., Johnson, L. D., Raynaud, F. I., et al.** (2013). Dual Blockade of the PI3K/AKT/mTOR (AZD8055) and RAS/MEK/ERK (AZD6244) Pathways Synergistically Inhibits Rhabdomyosarcoma Cell Growth In Vitro and In Vivo. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5940–5951.
- Rhoads, R. E.** (2009). eIF4E: New Family Members, New Binding Partners, New Roles. *J. Biol. Chem.* **284**, 16711–16715.
- Richter, J. D.** (2008). Breaking the Code of Polyadenylation-Induced Translation. *Cell* **132**, 335–337.
- Rogers, G. W., Richter, N. J., Lima, W. F. and Merrick, W. C.** (2001). Modulation of the Helicase Activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *J. Biol. Chem.* **276**, 30914–30922.
- Roig, J., Huang, Z., Lytle, C. and Traugh, J. A.** (2000). p21-Activated protein kinase gamma-PAK is translocated and activated in response to hyperosmolarity. Implication of Cdc42 and phosphoinositide 3- kinase in a two-step mechanism for gamma-PAK activation. *J. Biol. Chem.* **275**, 16933–16940.
- Rom, E., Kim, H. C., Gingras, A.-C., Marcotrigiano, J., Favre, D., Olsen, H., Burley, S. K. and Sonenberg, N.** (1998). Cloning and Characterization of 4EHP, a Novel Mammalian eIF4E-related Cap-binding Protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 13104–13109.
- Romasko, E. J., Amarnath, D., Midic, U. and Latham, K. E.** (2013). Association of Maternal mRNA and Phosphorylated EIF4EBP1 Variants With the Spindle in Mouse Oocytes: Localized Translational Control Supporting Female Meiosis in Mammals. *Genetics* **195**, 349–358.
- Rousseau, D., Gingras, A. C., Pause, A. and Sonenberg, N.** (1996). The eIF4E-binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth. *Oncogene* **13**, 2415–2420.
- Roux, M. M., Radeke, M. J., Goel, M., Mushegian, A. and Foltz, K. R.** (2008). 2DE identification of proteins exhibiting turnover and phosphorylation dynamics during sea urchin egg activation. *Dev. Biol.* **313**, 630–647.
- Rouya, C., Siddiqui, N., Morita, M., Duchaine, T. F., Fabian, M. R. and Sonenberg, N.** (2014). Human DDX6 effects miRNA-mediated gene silencing via direct binding to CNOT1. *RNA* **20**, 1398–1409.
- Ruggero, D., Montanaro, L., Ma, L., Xu, W., Londei, P., Cordon-Cardo, C. and Pandolfi, P. P.** (2004). The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. *Nat. Med.* **10**, 484–486.
- Ruvinsky, I. and Meyuhas, O.** (2006). Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 342–348.
- Salaün, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Bellé, R., Sonenberg, N. and Cormier, P.** (2003). eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* **255**, 428–439.
- Salaün, P., Le Breton, M., Morales, J., Bellé, R., Boulben, S., Mulner-Lorillon, O. and Cormier, P.** (2004). Signal transduction pathways that contribute to CDK1/cyclin B activation during the first mitotic division in sea urchin embryos. *Exp. Cell Res.* **296**, 347–357.

- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D.-H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D. M.** (2004). Rictor, a Novel Binding Partner of mTOR, Defines a Rapamycin-Insensitive and Raptor-Independent Pathway that Regulates the Cytoskeleton. *Curr. Biol.* **14**, 1296–1302.
- Scheper, G. C. and Proud, C. G.** (2002). Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur. J. Biochem.* **269**, 5350–5359.
- Scheper, G. C., Van Kollenburg, B., Hu, J., Luo, Y., Goss, D. J. and Proud, C. G.** (2002). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA. *J. Biol. Chem.* **277**, 3303–3309.
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W. and Selbach, M.** (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337–342.
- Schwanhäusser, B., Wolf, J., Selbach, M. and Busse, D.** (2013). Synthesis and degradation jointly determine the responsiveness of the cellular proteome. *BioEssays* **35**, 597–601.
- Shatsky, I. N., Dmitriev, S. E., Terenin, I. M. and Andreev, D. E.** (2010). Cap- and IRES-Independent Scanning Mechanism of Translation Initiation as an Alternative to the Concept of Cellular IRESs. *Mol. Cells* **30**, 285–293.
- Sodergren, E., Weinstock, G. M., Davidson, E. H., Cameron, R. A., Gibbs, R. A., Angerer, R. C., Angerer, L. M., Arnone, M. I., Burgess, D. R., Burke, R. D., et al.** (2006). The Genome of the Sea Urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* (5801). **314**, 941–952.
- Sonenberg, N., Morgan, M. A., Merrick, W. C. and Shatkin, A. J.** (1978). A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 4843–4847.
- Sonenberg, N., Rupprecht, K. M., Hecht, S. M. and Shatkin, A. J.** (1979). Eukaryotic mRNA cap binding protein: purification by affinity chromatography on sepharose-coupled m7GDP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4345–9.
- Song, J. L., Stoeckius, M., Maaskola, J., Friedländer, M., Stepicheva, N., Juliano, C., Lebedeva, S., Thompson, W., Rajewsky, N. and Wessel, G. M.** (2012). Select microRNAs are essential for early development in the sea urchin. *Dev. Biol.* **362**, 104–113.
- Srivastava, T., Fortin, D. A., Nygaard, S., Kaech, S., Sonenberg, N., Edelman, A. M. and Soderling, T. R.** (2012). Regulation of Neuronal mRNA Translation by CaM-Kinase I Phosphorylation of eIF4GII. *J. Neurosci.* **32**, 5620–5630.
- Standart, N. M., Bray, S. J., George, E. L., Hunt, T. and Ruderman, J. V** (1985). The small subunit of ribonucleotide reductase is encoded by one of the most abundant translationally regulated maternal RNAs in clam and sea urchin eggs. *J Cell Biol* **100**, 1968–1976.
- Stoneley, M. and Willis, A. E.** (2004). Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* **23**, 3200–3207.
- Su, Y. Q., Sugiura, K., Woo, Y., Wigglesworth, K., Kamdar, S., Affourtit, J. and Eppig, J. J.** (2007). Selective degradation of transcripts during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.* **302**, 104–117.

- Subtelny, A. O., Eichhorn, S. W., Chen, G. R., Sive, H. and Bartel, D. P.** (2014). Poly(A)-tail profiling reveals an embryonic switch in translational control. *Nature* **508**, 66–71.
- Suzuki, C., Garces, R. G., Edmonds, K. A., Hiller, S., Hyberts, S. G., Marintchev, A. and Wagner, G.** (2008). PDCD4 inhibits translation initiation by binding to eIF4A using both its MA3 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3274–3279.
- Svitkin, Y. V., Yanagiya, A., Karetnikov, A. E., Alain, T., Fabian, M. R., Khoutorsky, A., Perreault, S., Topisirovic, I. and Sonenberg, N.** (2013). Control of translation and miRNA-dependent repression by a novel poly(A) binding protein, hnRNP-Q. *PLoS Biol.* **11**, e1001564.
- Swartz, S. Z., Reich, A. M., Oulhen, N., Raz, T., Milos, P. M., Campanale, J. P., Hamdoun, A. and Wessel, G. M.** (2014). Deadenylation depletion protects inherited mRNAs in primordial germ cells. *Development* **141**, 3134–3142.
- Takada, H., Kawana, T., Ito, Y., Kikuno, R. F., Mamada, H., Araki, T., Koga, H., Asashima, M. and Taira, M.** (2009). The RNA-binding protein Mex3b has a fine-tuning system for mRNA regulation in early *Xenopus* development. *Development* **136**, 2413–2422.
- Tcherkezian, J., Cargnello, M., Romeo, Y., Huttlin, E. L., Lavoie, G., Gygi, S. P. and Roux, P. P.** (2014). Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5' TOP mRNA translation. *Genes Dev.* **28**, 357–371.
- Terenin, I. M., Andreev, D. E., Dmitriev, S. E. and Shatsky, I. N.** (2013). A novel mechanism of eukaryotic translation initiation that is neither m7G-cap-, nor IRES-dependent. *Nucleic Acids Res.* **41**, 1807–1816.
- Thoma, C., Bergamini, G., Galy, B., Hundsdoerfer, P. and Hentze, M. W.** (2004). Enhancement of IRES-mediated translation of the c-myc and BiP mRNAs by the poly(A) tail is independent of intact eIF4G and PABP. *Mol. Cell* **15**, 925–935.
- Thoreen, C. C., Kang, S. A., Chang, J. W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., Reichling, L. J., Sim, T., Sabatini, D. M. and Gray, N. S.** (2009). An ATP-competitive Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Reveals Rapamycin-resistant Functions of mTORC1. *J. Biol. Chem.* **284**, 8023–8032.
- Thoreen, C. C., Chantranupong, L., Keys, H. R., Wang, T., Gray, N. S. and Sabatini, D. M.** (2012). A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* **485**, 109–113.
- Truitt, M. L., Conn, C. S., Shi, Z., Pang, X., Tokuyasu, T., Coady, A. M., Seo, Y., Barna, M. and Ruggero, D.** (2015). Differential Requirements for eIF4E Dose in Normal Development and Cancer. *Cell* **162**, 59–71.
- Tsukiyama-Kohara, K., Poulin, F., Kohara, M., DeMaria, C. T., Cheng, A., Wu, Z., Gingras, A. C., Katsume, A., Elchebly, M., Spiegelman, B. M., et al.** (2001). Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1. *Nat. Med.* **7**, 1128–1132.
- Uniacke, J., Holterman, C. E., Lachance, G., Franovic, A., Jacob, M. D., Fabian, M. R., Payette, J., Holcik, M., Pause, A. and Lee, S.** (2012). An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery. *Nature* **486**, 126–130.

- Uniacke, J., Kishan Perera, J., Lachance, G., Francisco, C. B. and Lee, S.** (2014). Cancer Cells Exploit eIF4E2-Directed Synthesis of Hypoxia Response Proteins to Drive Tumor Progression. *Cancer Res.* **74**, 1379–1389.
- Vogel, C. and Marcotte, E. M.** (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 227–232.
- Von der Haar, T., Gross, J. D., Wagner, G. and McCarthy, J. E. G.** (2004). The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat. Struct. & Mol. Biol.* **11**, 503–511.
- Von Manteuffel, S. R., Gingras, A. C., Ming, X. F., Sonenberg, N. and Thomas, G.** (1996). 4E-BP1 phosphorylation is mediated by the FRAP-p70s6k pathway and is independent of mitogen-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 4076–4080.
- Wagenaar, E. B.** (1983). The timing of synthesis of proteins required for mitosis in the cell cycle of the sea urchin embryo. *Exp. Cell Res.* **144**, 393–403.
- Wang, X., Flynn, A., Waskiewicz, A. J., Webb, B. L. J., Vries, R. G., Baines, I. A., Cooper, J. A. and Proud, C. G.** (1998). The phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF4E in response to phorbol esters, cell stresses, and cytokines is mediated by distinct MAP kinase pathways. *J. Biol. Chem.* **273**, 9373–9377.
- Wang, T., Cui, Y., Jin, J., Guo, J., Wang, G., Yin, X., He, Q.-Y. and Zhang, G.** (2013). Translating mRNAs strongly correlate to proteins in a multivariate manner and their translation ratios are phenotype specific. *Nucleic Acids Res.* **41**, 4743–4754.
- Waters, L. C., Strong, S. L., Ferlemann, E., Oka, O., Muskett, F. W., Veverka, V., Banerjee, S., Schmedt, T., Henry, A. J., Klempnauer, K. H., et al.** (2011). Structure of the tandem MA-3 region of Pcd4 protein and characterization of its interactions with eIF4A and eIF4G: Molecular mechanisms of a tumor suppressor. *J. Biol. Chem.* **286**, 17270–17280.
- Weill, L., Belloc, E., Bava, F.-A. and Méndez, R.** (2012). Translational control by changes in poly(A) tail length: recycling mRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 577–585.
- Whitaker, M.** (2006). Calcium microdomains and cell cycle control. *Cell Calcium* **40**, 585–592.
- Wilt, F. H.** (1977). The dynamics of maternal poly(A)-containing mRNA in fertilized sea urchin eggs. *Cell* **11**, 673–681.
- Winkler, M. M., Nelson, E. M., Lashbrook, C. and Hershey, J. W.** (1985). Multiple levels of regulation of protein synthesis at fertilization in sea urchin eggs. *Dev. Biol.* **107**, 290–300.
- Yajima, M. and Wessel, G. M.** (2015). Essential elements for translation: the germline factor Vasa functions broadly in somatic cells. *Development* **142**, 1960–1970.
- Yanagiya, A., Suyama, E., Adachi, H., Svitkin, Y. V., Aza-Blanc, P., Imataka, H., Mikami, S., Martineau, Y., Ronai, Z. A. and Sonenberg, N.** (2012). Translational Homeostasis via the mRNA Cap-Binding Protein, eIF4E. *Mol. Cell* **46**, 847–858.
- Zhang, G., Wang, T. and He, Q.** (2014). How to discover new proteins—translatome profiling. *Sci. China Life Sci.* **57**, 358–360.

- Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W. and Hall, M. N.** (2011). Activation of mTORC2 by Association with the Ribosome. *Cell* **144**, 757–768.
- Zomzely, C. E., Roberts, S., Brown, D. M. and Provost, C.** (1966). Cerebral protein synthesis. I. Physical properties of cerebral ribosomes and polyribosomes. *J. Mol. Biol.* **19**, 455–468.
- Zoncu, R., Efeyan, A. and Sabatini, D. M.** (2011a). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 21–35.
- Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y. and Sabatini, D. M.** (2011b). mTORC1 Senses Lysosomal Amino Acids Through an Inside-Out Mechanism That Requires the Vacuolar H⁺-ATPase. *Science (6056)*. **334**, 678–683.
- Zuberek, J., Kubacka, D., Jablonowska, A., Jemielity, J., Stepinski, J., Sonenberg, N. and Darzynkiewicz, E.** (2007). Weak binding affinity of human 4EHP for mRNA cap analogs. *RNA* **13**, 691–697.

Liste des figures

Figure 1 : Régulation de l'ARN	16
Figure 2 : Structure de l'ARNm mature	17
Figure 3 : Initiation de la traduction chez les eucaryotes	21
Figure 4 : Modèle en boucle du complexe d'initiation de la traduction dépendante de la coiffe.....	23
Figure 5 : Observation d'un polysome par microscopie électronique à transmission	24
Figure 6 : Régulation de la formation du complexe ternaire	25
Figure 7 : Régulations de l'expression de GCN4 par les uORFs	28
Figure 8 : Régulations de l'expression d'ATF4 par les uORFs.....	29
Figure 9 : Régulation de la formation du complexe eIF4F par 4E-BP	31
Figure 10 : Caractéristiques des trois eIF4E.....	33
Figure 11 : Régulations d'eIF4E1 et eIF4E3 par les Mnk.....	37
Figure 12 : Caractéristiques d'eIF4GI et de ses homologues	39
Figure 13 : Représentation schématique du complexe d'initiation alternatif DAP5-eIF4A-eIF2	43
Figure 14 : Régulation de PABP par les PAIPs.....	44
Figure 15 : Représentation schématique des deux complexes mTORC1 et mTORC2	48
Figure 16 : Voie de signalisation mTOR et modes d'activation du complexe mTORC1	49
Figure 17 : Voie de signalisation MAPK en amont du contrôle traductionnel.....	52
Figure 18 : Rétrocontrôles des voies de signalisation mTOR et MAPK.....	54
Figure 19 : Communication entre les voies de signalisation mTOR et MAPK.....	55
Figure 20 : Régulations d'un ARNm mature.....	56
Figure 21 : Régulation traductionnelle par la polyadénylation cytoplasmique	58
Figure 22 : Inhibition de la traduction par les miR.....	61
Figure 23 : Traduction dépendante des IRES dans la cellule eucaryote.....	64
Figure 24 : Traduction par les CITE.....	65
Figure 25 : Transcriptome vs traductome	66
Figure 26 : Techniques d'étude du traductome	68

Figure 27 : Changements traductionnels au cours du développement précoce	72
Figure 28 : Schéma récapitulatif des différents évènements ayant lieu à la fécondation chez l'oursin	79
Figure 29 : Régulations traductionnelles à la fécondation de l'embryon d'oursin	81
Figure 30 : Schéma bilan des connaissances actuelles concernant l'augmentation de synthèse protéique à la fécondation chez l'oursin	85
Figure 31 : Régulation de la traduction de la Cycline B dans l'embryon d'oursin	120
Figure. 32 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus suite à l'analyse du traductome de l'embryon d'oursin d'une cellule	152
Figure 33 : Régulations traductionnelles du complexe eIF4F	202
Figure. 34 : Particularités des facteurs de traduction néosynthétisés à la fécondation	237
Figure 35 : Complexes alternatifs hypothétiques de l'initiation de la traduction dans l'embryon d'oursin	240
Figure 36 : Modèle de la reprise de la traduction à la fécondation de l'embryon d'oursin au début de la thèse	242
Figure 37 : Schématisation de l'apport du travail de thèse à la compréhension de la reprise de la traduction à la fécondation de l'embryon d'oursin	243

Liste des tableaux

Tableau I : Facteurs d'initiation de la traduction eucaryotes	19
Tableau II : Dépendances de la traduction à la voie mTOR et transcrits concernés	228
Tableau III : Sensibilité de la traduction à la double inhibition mTOR/MAPK et transcrits concernés	230

La synthèse protéique est une étape importante de la régulation de l'expression des gènes. Dans beaucoup d'espèces animales, les premières étapes du développement embryonnaire sont majoritairement ou exclusivement basées sur l'utilisation des messagers maternels stockés dans l'ovocyte. L'embryon d'oursin est un modèle avantageux pour l'étude du contrôle traductionnel de l'expression des gènes lors du développement précoce. La fécondation provoque l'activation de la machinerie traductionnelle conduisant à une augmentation de synthèse protéique nécessaire à la reprise des cycles mitotiques et au départ du développement embryonnaire. Les modifications touchant la machinerie traductionnelle qui ont lieu à la fécondation sont à l'origine du recrutement polysomal des messagers stockés. Ainsi, l'ensemble des ARNm maternels est-il globalement traduit, ou existe-t-il une sélection des ARNm qui vont être traduits précocement ? Et s'il y en a, quels sont les modes de sélection ?

Au cours de ce travail de thèse, nous avons obtenu le répertoire complet des ARNm traductionnellement régulés à la fécondation, et montré que seule une sous-partie du stock de messenger est traduite en réponse à la fécondation, avec un enrichissement de messagers codant pour des protéines régulatrices. Enfin, de manière originale, ce travail a permis la mise en évidence de la diversité et de la complexité des voies de signalisation en amont de la régulation traductionnelle, qui concourent à la sélectivité de la traduction.

Mots-clés : traductome ; régulation traductionnelle ; voie de signalisation mTOR ; fécondation ; cycle cellulaire.

[Translational regulations in early sea urchin embryo: mRNA recruitment into polysomes at fertilization]

Protein synthesis is a crucial step for gene expression regulation. In many animal species, the early steps of development are based on translation of stored maternal mRNAs. Sea urchin embryo is a powerful model to study translational control during early development. Fertilization triggers the activation of translational machinery, leading to the increase of protein synthesis which is necessary to cell cycle entry and early embryonic development. Translational machinery modifications are responsible for the polysomal recruitment of the stored maternal mRNAs. Thus, are all the stored maternal mRNAs translated, or is there any selection of the translated mRNAs? If so, what are the mechanisms driving this selectivity?

Over this work, we obtained the entire subset of the translationally regulated mRNAs, and demonstrated that only a part of the stored maternal mRNAs is actively translated at sea urchin fertilization, with an important enrichment of mRNAs coding for regulatory proteins. Finally, this work highlighted the diversity and the complexity of the signaling network upstream the selective polysomal recruitment.

Keywords: translome; translational control; mTOR signaling pathway; sea urchin fertilization; cell cycle.